



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DEL FÁRMACO AMILORIDA SOBRE LAS
PROPIEDADES BIOFÍSICAS DE LOS CANALES DE
CALCIO TIPO T CLONADOS DE HUMANO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A

OSBALDO LÓPEZ CHARCAS



MÉXICO, D.F.

2011



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dr. JOSE PEDRAZA CHAVERRI
VOCAL: Dra. CLARA ESTELA DIAZ VELASQUEZ
SECRETARIO: Dr. JUAN CARLOS GOMORA MARTINEZ
1er. SUPLENTE: Dr. ALEJANDRO ORTIZ OSORNIO
2do. SUPLENTE: Dra. MARIA EVA GONZALEZ TRUJANO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE NEUROLOGÍA MOLECULAR,
DIVISIÓN DE NEUROCIENCIAS, INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR,
UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. JUAN CARLOS GÓMORA MARTÍNEZ

SUSTENTANTE:

OSBALDO LÓPEZ CHARCAS

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

El presente trabajo de tesis se desarrollo en la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, bajo la tutoría del Dr. Juan Carlos Gómora Martínez.

Este proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT proyecto J50250-Q), y por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la DGAPA-UNAM.

Durante la realización de este proyecto recibí una beca correspondiente a la formación de recursos humanos por el donativo del Dr. Gómora proveniente de CONACYT (Proyecto J50250-Q), y en la fase final recibí otra beca financiada por el Dr. Manuel Rivera, de quien también recibí asesoría para los ensayos de acoplamiento molecular.

Ha sido un viaje largo y quizás complicado, pero finalmente estoy aquí, sentado y escribiendo, realizando una retrospección, cerrando un ciclo de mi vida, terminando y comenzando a la vez, es por eso que hoy deseo agradecer a Dios y todo lo que ello signifique.

Este trabajo está dedicado a mi madre, María de Jesús y a mi padre, Gilberto, quienes han sido un pilar fundamental en mi desarrollo personal y profesional; también lo dedico, a mis hermanos: Ana, Felipe, Gilberto, Carolina, Luciano, Gerardo y Javier y a sus cónyuges: Moisés, Isabel, Alicia, José, Leticia y Rocío, de quienes siempre he tenido un apoyo incondicional y sus consejos han sido verdaderamente valiosos en mi vida.

Por supuesto, agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, por todo lo que me ha dado, por el orgullo de ser universitario, por salvarme de las fauces de la ignorancia, por ser la institución más noble que haya conocido en mi vida, y por permitirme alcanzar esta meta.

Agradezco a la Facultad de Química y a sus profesores, quienes me formaron como profesionalista y sembraron en mi un compromiso social y valores inquebrantables.

Agradezco al Dr. Juan Carlos Gómora Martínez por la oportunidad que me brindó de ingresar a su laboratorio, por su tutoría excepcional y su compromiso en mi formación.

Agradezco a mis amigos y compañeros de trabajo; Laura, Sarahí, Rogelio, Manolo, Everardo, Clara, Kioshy, Yendi, Lucía y por supuesto Joy por su gentil apoyo y por el intercambio de ideas.

Dedico este trabajo a todos mis amigos, viejos y nuevos, de quienes no enlisto su nombre por temor a olvidar alguno, pero sé que cuando lean estas líneas sabrán que me refiero a ustedes.

CONTENIDO

I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1. Canales iónicos.....	3
2.2. Canales de calcio dependientes de voltaje.....	5
A. Clasificación de los canales de calcio dependientes de voltaje.....	6
B. Composición y propiedades moleculares de los canales Ca_v3	8
C. Modelo cinético de la activación de los canales Ca_v3	12
2.3. Amilorida.....	15
A. Mecanismo de acción de la amilorida.....	16
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	19
IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	20
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
5.1. Cultivo celular.....	21
5.2. Electrofisiología.....	22
A. Soluciones de registro.....	22
B. Electrodo de registro.....	22
C. Experimentos de fijación de voltaje.....	23
D. Protocolos de voltaje.....	25
E. Análisis de datos.....	28
5.3. Modelado y acoplamiento molecular.....	30
VI. RESULTADOS.....	32
6.1. Efecto farmacológico de la amilorida.....	32
A. Bloqueo diferencial de los canales Ca_v3 por amilorida.....	32
B. Efecto de la amilorida en la activación dependiente de voltaje de los canales Ca_v3	35
C. Efecto de la amilorida sobre la cinética de activación, inactivación y desactivación de los canales Ca_v3	39
6.2. Mecanismo del bloqueo de la amilorida.....	43
A. Bloqueo dependiente de voltaje.....	43
B. Efecto de la amilorida sobre la inactivación en el estado estacionario.....	47
C. La amilorida no interacciona con el estado cerrado de los canales Ca_v3	49
D. Acoplamiento molecular de la amilorida con los canales Ca_v3	50
E. Efecto de la amilorida en la recuperación de la inactivación de los canales Ca_v3	54
F. Efecto de la amilorida intracelular en la actividad de los canales Ca_v3	56
VII. DISCUSIÓN.....	59
7.1. Bloqueo de canales Ca_v3 por amilorida.....	59
7.2. Mecanismo de bloqueo de la amilorida en los canales Ca_v3	61
7.3. Efecto de la amilorida sobre la cinética de los canales Ca_v3	64
7.4. Aportaciones del acoplamiento molecular al mecanismo de bloqueo de los canales Ca_v3 por la amilorida.....	65
VIII. CONCLUSIONES.....	67
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	68
APÉNDICE.....	75
Breve historia de la excitabilidad celular y los canales iónicos.....	75

I. RESUMEN

El ión Ca^{2+} es una señal intracelular crucial en funciones celulares como la liberación de hormonas y neurotransmisores, la contracción muscular, el metabolismo, la expresión génica, y otras. Algunos de estos procesos biológicos suceden en respuesta a cambios en el potencial de membrana de las células y son orquestados por el funcionamiento de los canales de calcio dependientes de voltaje (Ca_V). El uso de fármacos, toxinas y compuestos orgánicos para bloquear las corrientes generadas por los canales Ca_V , ha sido explotado ampliamente para el estudio de funciones básicas de estas proteínas, así como para su uso como agentes terapéuticos en el tratamiento de algunas enfermedades. La amilorida es un diurético ahorrador de potasio que fue sintetizado por los laboratorios Merck en 1965 y su blanco molecular es el canal epitelial de sodio, ENaC. La interacción molecular de éste con amilorida se ha explorado a través de modelos por homología, ya que a la fecha no existe ninguna estructura del canal ENaC resuelta por cristalografía de rayos X. Por otro lado, la amilorida también se ha utilizado como una herramienta farmacológica para el estudio de los canales Ca_V , concretamente aquellos que se conocen como canales LVA, tipo T o Ca_V3 , de los cuales tampoco existen estructuras cristalográficas resueltas. Además, subsisten discrepancias controversias en relación a los valores de IC_{50} de amilorida reportados para los canales Ca_V3 , que van desde el orden micromolar hasta el milimolar, dependiendo del tipo celular en el que se estudien dichos canales. Por lo anterior, en el presente trabajo se planteó la posibilidad de que la amilorida pudiera interactuar con diferentes sitios en la proteína de los tres canales Ca_V3 ($\text{Ca}_V3.1$, $\text{Ca}_V3.2$ y $\text{Ca}_V3.3$), lo cual, aunado a la expresión diferencial de dichos canales en varios tipos celulares, podría explicar las diferencias en sensibilidad al diurético hasta ahora reportadas. Una motivación adicional de este trabajo fue proporcionar información original sobre el mecanismo de bloqueo de la amilorida sobre los canales Ca_V3 y la ubicación de los posibles sitios de unión del fármaco en la proteína de estos canales. Los resultados obtenidos confirmaron nuestra hipótesis del bloqueo diferencial de los canales Ca_V3 , con una preferencia importante sobre el canal $\text{Ca}_V3.2$. Además de inhibir propiamente la corriente, la amilorida modificó algunas propiedades biofísicas de los canales mediante su interacción con el estado abierto e inactivado de dichos canales. Interesantemente, solo el bloqueo de los canales $\text{Ca}_V3.3$ presentó un componente dependiente de voltaje. Los

resultados del modelado molecular y acoplamiento de la amilorida con los canales Ca_v3 proporcionaron información relevante que permitió explicar el mecanismo de bloqueo de la amilorida, así como las diferentes afinidades del diurético por los canales Ca_v3 .

II. INTRODUCCIÓN

2.1. Canales iónicos

Las células procariotas y eucariotas están provistas de membranas lipídicas que contienen 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 transporte de iones a favor de su gradiente de concentración, sin ningún tipo de gasto energético. La activación (proceso por el cual se genera el transporte de iones) de un canal iónico es debida a la respuesta específica ante algún estímulo, como la unión de un ligando específico directamente en el canal, por un cambio en el voltaje de la membrana, una deformación mecánica o un estímulo sensorial (Lipscombe, 2001).

Los canales iónicos son proteínas de membrana que permiten el flujo rápido de iones a través de un poro que conecta el espacio extracelular con el intracelular. Estas proteínas son indispensables para la generación y propagación de señales eléctricas (potenciales de acción) en los organismos; además, 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, el procesamiento de información en el cerebro y la salida hacia tejidos periféricos, la expresión de genes y la división celular (Hille, 2001). 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.

La noción inicial de la existencia de los canales iónicos fue establecida por los trabajos pioneros de Hodgkin & Huxley a principios de los años 50 del siglo pasado (Hodgkin &

Huxley, 1952a, 1952b, 1952c; Hodgkin *et al.*, 1952). No obstante, fue hasta poco más de 25 años después que se conoció la naturaleza proteica de los canales, primero del receptor a acetilcolina (Conti-Tronconi & Raftery, 1982; Noda *et al.*, 1983a) y subsecuentemente de los canales de sodio (Noda *et al.*, 1984) y de calcio (Tanabe *et al.*, 1987) dependientes de voltaje. Paralelo a estos descubrimientos, el desarrollo y mejoramiento de la técnica de *patch clamp* (Hamill *et al.*, 1981) 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⁺, Ca²⁺ o Cl⁻), (ii) el estímulo que desencadena la apertura del poro del canal (p. ej., voltaje, ligando o temperatura, etc.), (iii) la función que el canal iónico realiza (p. ej. canales iónicos de las uniones comunicantes “*gap-junctions*”), y (iv) las características farmacológicas del canal iónico (p. ej. canales iónicos receptores de rianodina y NMDA) (Lipscombe, 2001).

Desde el punto de vista estructural, los canales iónicos pueden ser complejos proteicos formados por tetrámeros, pentámeros o hexámeros. En todos los casos el arreglo tridimensional de la proteína en la membrana promueve la formación de un poro central por el cual transitan los iones correspondientes (**Fig. 1**). Dentro del grupo de los tetrámeros se encuentran los canales activados por voltaje (de Na⁺, K⁺, Ca²⁺ y Cl⁻), y los canales TRP (aquellos que se activan por temperatura, por ejemplo). Los canales activados por ligandos como la acetilcolina, glicina y otros neurotransmisores, presentan una composición pentamérica, mientras que las uniones comunicantes (*gap junctions*) son los representantes de los canales iónicos de composición hexamérica (Hille, 2001). Más recientemente, no obstante, se ha demostrado que los canales activados por ATP, conocidos como canales purinérgicos, presentan una composición trimérica en su estado funcional (Stojilkovic *et al.*, 2005).

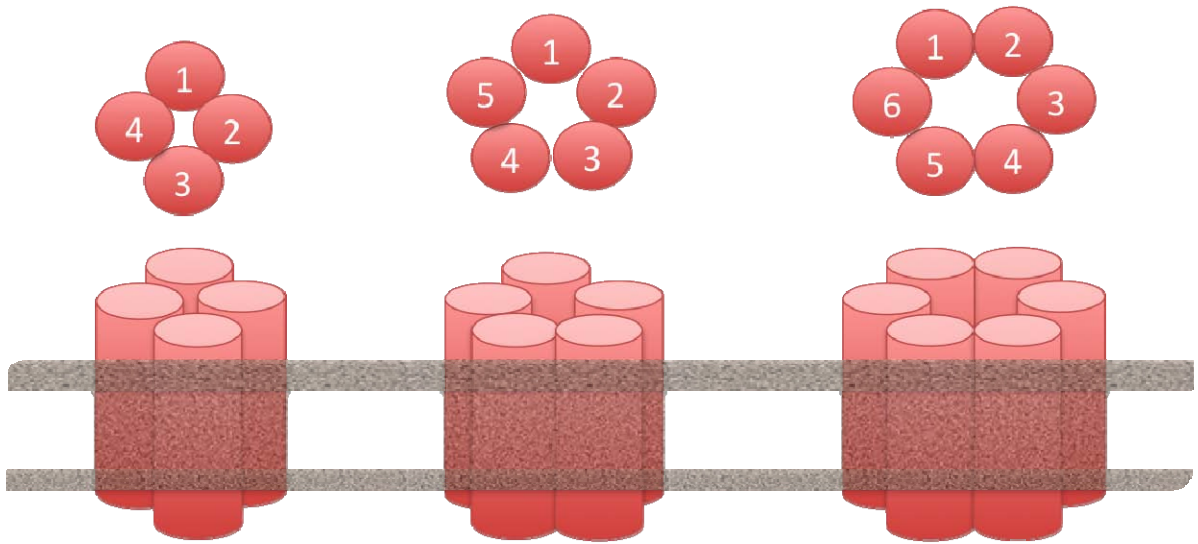


Figura 1. Organización de los canales iónicos en la membrana. Tres principales organizaciones transmembranales adoptan los canales iónicos; en forma de tetrámeros, pentámeros y hexámeros. En cada caso el poro del canal está ubicado en el centro del complejo proteico y cada subunidad de la proteína cruza la membrana de 2 a 6 veces.

Cada uno de los tipos de canales mencionados cumple funciones específicas en las células que se 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 dependientes de voltaje. La superfamilia de canales dependientes de voltaje, 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} (Sather & McCleskey, 2003). Estos canales 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 (Hille, 2001).

2.2. Canales de calcio dependientes de voltaje

Dentro de la superfamilia de los canales dependientes de voltaje se encuentran los canales que transportan selectivamente iones Ca^{2+} , llamados canales Ca_v (Ertel *et al.*, 2000). El ión Ca^{2+} es una señal intracelular clave, ya que modula muchas funciones celulares como lo es la excitación de hormonas y neurotransmisores, la contracción

muscular, el metabolismo, la expresión de genes, la proliferación, la fertilización, etc. (Berridge *et al.*, 2003; Uhlen & Fritz, 2010). En la mayoría de dichos eventos el calcio requerido entra a la célula a través de los canales Ca_v .

En células que son capaces de producir y responder a señales eléctricas, denominadas células excitables (Aidley, 1996), tales como neuronas, células cardíacas, células musculares y células secretoras, los canales Ca_v participan de manera importante (Hille, 2001; Perez-Reyes, 2003). 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 (Darszon *et al.*, 2006). Desde hace varias décadas, se han usado en la clínica los llamados “bloqueadores de canales de calcio” para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, tales como la hipertensión y la angina de pecho (Mitterdorfer *et al.*, 1998), y más recientemente para el tratamiento del dolor neuropático y la epilepsia de tipo ausencia (Gomora *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001; Todorovic *et al.*, 2001a; Todorovic *et al.*, 2001b; Tyagarajan *et al.*, 2011). Por estas razones, la importancia de los canales Ca_v se acentúa y su uso como blancos moleculares para el tratamiento de diversas enfermedades es indiscutible. Sin embargo, mucho hace falta por conocer acerca de la estructura y función de estas proteínas, así como aspectos farmacológicos y biofísicos, por ello, resulta importante realizar un mayor número de 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

Existe una nomenclatura para los canales de calcio dependientes de voltaje (Ertel *et al.*, 2000), en la que el nombre de cada canal esta dado por la abreviación del ión que transportan (Ca), seguido del subíndice v , en alusión al estímulo que los activa (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 dependientes de voltaje (**Fig. 2**). Los canales Ca_v se caracterizan por presentar diferentes propiedades biofísicas y farmacológicas, las cuales dependen en gran

medida de la secuencia de la subunidad formadora de poro denominada subunidad α_1 , de las cuales existen 10 genes que codifican para ellas (**Fig. 2**).

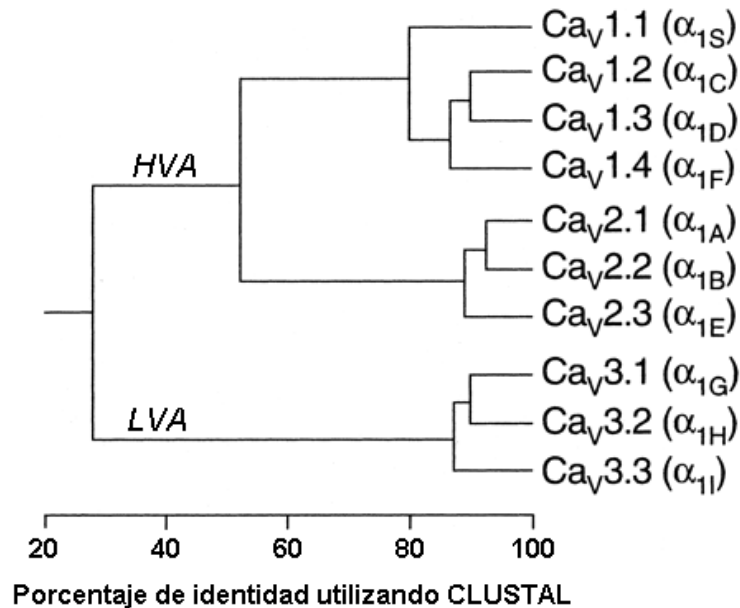


Figura 2. Árbol filogenético de las subunidades α_1 de los canales Ca_V . Porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos de la subunidad α_1 de los canales de calcio dependientes de voltaje. La secuencia completa de cada subunidad α_1 fue reducida exclusivamente a las regiones que atraviesan la membrana y las asas del poro, lo cual generó un archivo de ~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 Perez-Reyes, 1999).

Los canales Ca_V se subdividen en dos grupos principales, aquellos que son activados por voltajes altos o HVA (por sus siglas en inglés), y los que se activan por voltajes bajos o LVA. Los canales HVA están constituidos a su vez por dos familias, denominadas Ca_V1 que comprende cuatro miembros ($\text{Ca}_V1.1$ - $\text{Ca}_V1.4$) y Ca_V2 , formada por tres miembros ($\text{Ca}_V2.1$ - $\text{Ca}_V2.3$) (**Fig. 2**). Además de requerir fuertes despolarizaciones del potencial de membrana (V_m ; entre -30 y -20 mV) para su activación (apertura), los canales HVA se caracterizan además por 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 familia, los Ca_V3 , constituida por tres miembros

(Ca_v3.1, Ca_v3.2 y Ca_v3.3), estos canales se activan por pequeñas despolarizaciones a potenciales muy 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 (Armstrong & Matteson, 1985; Nilius *et al.*, 1985; Nowycky *et al.*, 1985; Bean, 1989; Catterall, 2000; Burgess *et al.*, 2002).

Los canales de la familia Ca_v1 generan corrientes tipo L o de larga duración y son sensibles a fármacos conocidos como dihidropiridinas (**Tabla 1**). Los canales de la familia 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 familia 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 (Nilius *et al.*, 1985; Nowycky *et al.*, 1985).

B. Composición y propiedades moleculares de los canales Ca_v

Los canales de las familias Ca_v1 y Ca_v2 son complejos moleculares compuestos por cuatro unidades proteicas principales (revisado por Arikath & Campbell, 2003) (**Fig. 3**): (i) una proteína integral de membrana que es la subunidad formadora del poro de conducción iónica, nombrada α_1 , además de contener las regiones del canal que detectan el voltaje y la sensibilidad a fármacos; (ii) una subunidad citoplasmática denominada β , de la cual existen cuatro isoformas (β_1 , β_2 , β_3 y β_4), y que modula varias propiedades biofísicas y de tráfico del canal hacia la membrana celular; (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, $\alpha_2\delta$ -2, $\alpha_2\delta$ -3, y $\alpha_2\delta$ -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 (Davies *et al.*, 2007; Bauer *et al.*, 2010); y (iv) una subunidad de cuatro segmentos transmembranales denominada γ , con ocho isoformas (γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4 , γ_5 , γ_6 , γ_7 y γ_8), la cual modifica las

propiedades biofísicas del canal, sin afectar el número de canales en la membrana (Arikkath & Campbell, 2003; Kang & Campbell, 2003; Zamponi, 2005).

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

Nombre del canal	Tipo de corriente	Localización	Antagonistas específicos	Funciones celulares
Ca _v 1.1	L	Músculo esquelético; túbulos transversos	Dihidropiridinas; fenilalquilaminas; Benzotiazepinas	Acople excitación-contracción
Ca _v 1.2	L	Miocitos cardíacos; células endocrinas; cuerpos celulares neuronales; dendritas	Dihidropiridinas; fenilalquilaminas; Benzotiazepinas	Acople excitación-contracción; liberación de hormonas; regulación de transcripción; integración sináptica
Ca _v 1.3	L	Células endocrinas; cuerpos celulares neuronales y dendritas; miocitos auriculares cardíacos y células marcapaso, célula coclear del cabello	Dihidropiridinas; fenilalquilaminas; benzotiazepinas	Liberación de hormonas; regulación de transcripción; regulación sináptica; marcapaso cardíaco; liberación de neurotransmisor a partir de células sensoriales
Ca _v 1.4	L	Células bastón y bipolar de la retina; médula espinal; glándula adrenal; células cebadas	Dihidropiridinas; fenilalquilaminas; Benzotiazepinas	Liberación de neurotransmisores a partir de fotorreceptores
Ca _v 2.1	P/Q	Terminales nerviosas y dendritas; células neuroendocrinas	ω-Agatoxina IVA	Liberación de neurotransmisores; transientes de Ca ²⁺ dendríticos; liberación de hormonas
Ca _v 2.2	N	Terminales nerviosas y dendritas; células neuroendocrinas	ω-Conotoxina-GVIA	Liberación de neurotransmisores; transientes de Ca ²⁺ dendríticos; liberación de hormonas
Ca _v 2.3	R	Cuerpos celulares neuronales y dendritas	SNX-482	Disparo en ráfaga del potencial de acción; transientes de Ca ²⁺ dendrítico
Ca _v 3.1	T	Cuerpos celulares neuronales y dendritas; miocitos del músculo liso y cardíaco	Mibefradil	Marcapaso; disparo en ráfaga del potencial de acción
Ca _v 3.2	T	Cuerpos celulares neuronales y dendritas; miocitos del músculo liso y cardíaco	Mibefradil	Marcapaso; disparo en ráfaga del potencial de acción
Ca _v 3.3	T	Cuerpos celulares neuronales y dendritas	Mibefradil	Marcapaso; disparo en ráfaga del potencial de acción

(Modificada de Catterall, 2000).

En lo que corresponde a los canales de la familia Ca_v3, éstos están constituidos únicamente por la subunidad principal α₁, aunque algunos trabajos han encontrado 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 (Dolphin *et al.*, 1999; Dubel *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 2004; Arteaga, 2007; Higueldo, 2007).

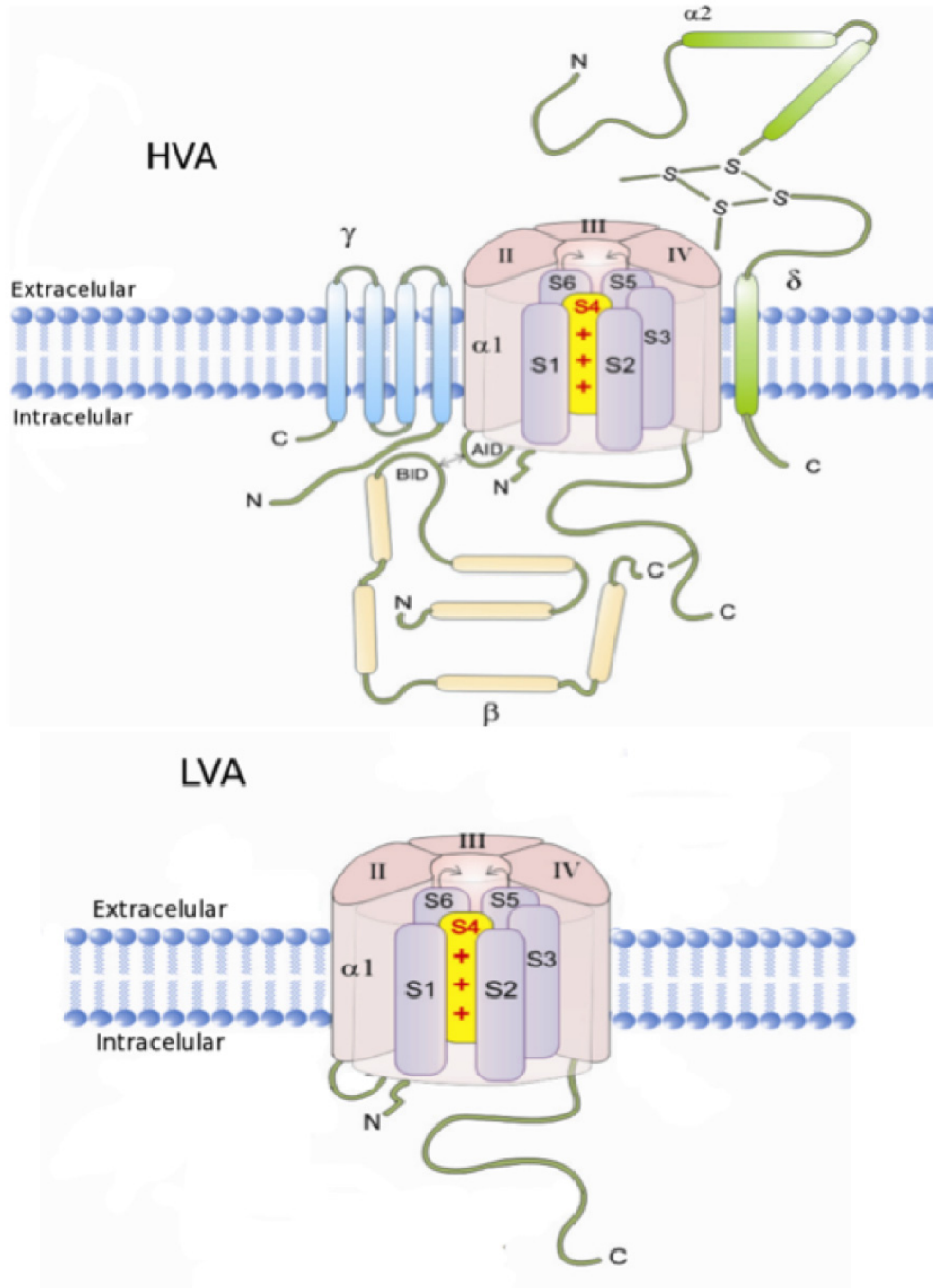


Figura 3. Representación esquemática del ensamblaje de los canales Ca_v. La figura ilustra los cuatro dominios repetidos de la subunidad α₁ formadora de poro (I-IV), en el dominio I se han expuesto los 6 segmentos transmembranales (S1-S6) como cilindros púrpuras. La subunidad α₁ se encuentra asociada con las subunidades accesorias α₂δ (en color verde), β (en color melón), y γ (en azul) en los canales HVA, por el contrario, la subunidad α₁ 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 α₁ 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 α₂δ se encuentra anclada a la membrana e interactúa con la parte extracelular de la subunidad α₁. La subunidad γ es una proteína constituida por cuatro segmentos transmembranales (Modificada de Randall & Benham, 1999).

La subunidad $\alpha 1$ forma el poro que permite el flujo de iones y contiene regiones especializadas que determinan la selectividad del canal y su sensibilidad al voltaje (sensor de voltaje), es decir, por sí sola puede generar corrientes iónicas. De acuerdo con perfiles de hidrofobicidad, modelos de la estructura secundaria y terciaria de la subunidad $\alpha 1$ de canales Ca_v , estas proteínas son cadenas de aminoácidos (aa) 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. 4**). 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^+ , cuya subunidad α también contiene sensor de voltaje (S4) y comparte varias similitudes con los canales Ca_v , 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 (Jiang *et al.*, 2003a; Jiang *et al.*, 2003b). Es probable que debido a la similitud entre estos dos tipos de canales dependientes de voltaje, el arreglo de la subunidad $\alpha 1$ de los canales Ca_v sea como la de los canales de K^+ . En este sentido, existen fuertes evidencias experimentales que indican que en los canales Ca_v las asas del poro forman el vestíbulo externo del canal y el filtro de selectividad, por lo que su secuencia de aa es un factor determinante de la conductancia, la selectividad iónica del canal y de su afinidad por diversas toxinas que modifican la actividad de la subunidad $\alpha 1$ (para una revisión véase Catterall, 2000).

Una característica molecular de los canales activados por voltaje y por consiguiente de los canales Ca_v , es el segmento S4, el cual presenta un patrón de aa característico, ya que cada tres residuos, existe uno con carga positiva, y con base a una serie de evidencias se le ha designado como sensor de voltaje (revisado por Tombola *et al.*, 2005, 2006), ya que este segmento es capaz de 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.

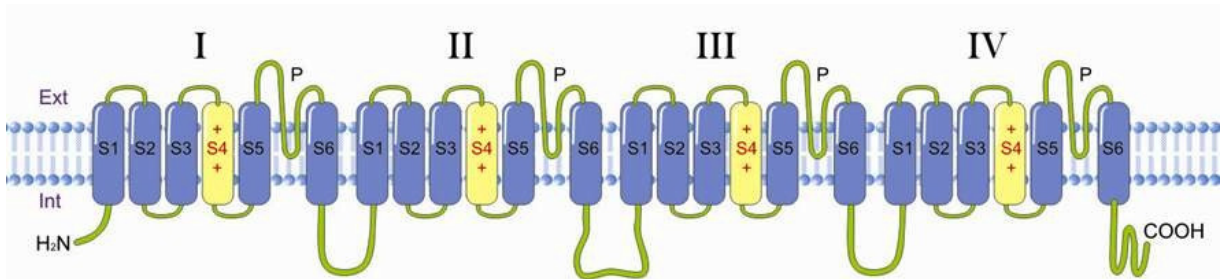


Figura 4. Diagrama topológico de la subunidad α_1 de los canales Ca_v . Los canales de calcio HVA y LVA está compuesto por una proteína integral de membrana de aproximadamente 270 kDa denominada subunidad α_1 , la cual está constituida por cuatro repetidos (I-IV), cada uno de los cuales con seis regiones transmembranales (S1 a S6) y una asa de poro (P). El segmento S4 presenta aa 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.

C. Modelo cinético de la activación de los canales Ca_v3

El funcionamiento básico de los canales Ca_v3 se ilustra en la **Fig. 5A y B**. 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 o cerrado. 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. Sin embargo, este mismo proceso de apertura se acompaña de otro, al cual se le denomina inactivación, mismo que provocará el cese del flujo de iones a través del canal, a pesar de que este se encuentre en el estado abierto. La inactivación de los canales varía en el tipo de mecanismo que la origina, la proporción de canales que la padecen y la velocidad a la que sucede (cinética de inactivación), por lo que es una característica distintiva de diferentes tipos de canales. Por último, cuando el valor de V_m regresa a su valor original o de reposo (repolarización), los canales regresan al estado cerrado.

Las transiciones entre el estado abierto y cerrado de los canales Ca_v3 han sido estudiadas en varias preparaciones celulares y se ha encontrado que este tipo de canales cuando se abren en respuesta a pulsos despolarizantes, lo hacen en ráfagas, es decir, los canales se abren y se cierran muchas veces en un periodo de tiempo muy corto, después permanecen sin actividad por un tiempo, y sólo en algunos valores de V_m pueden

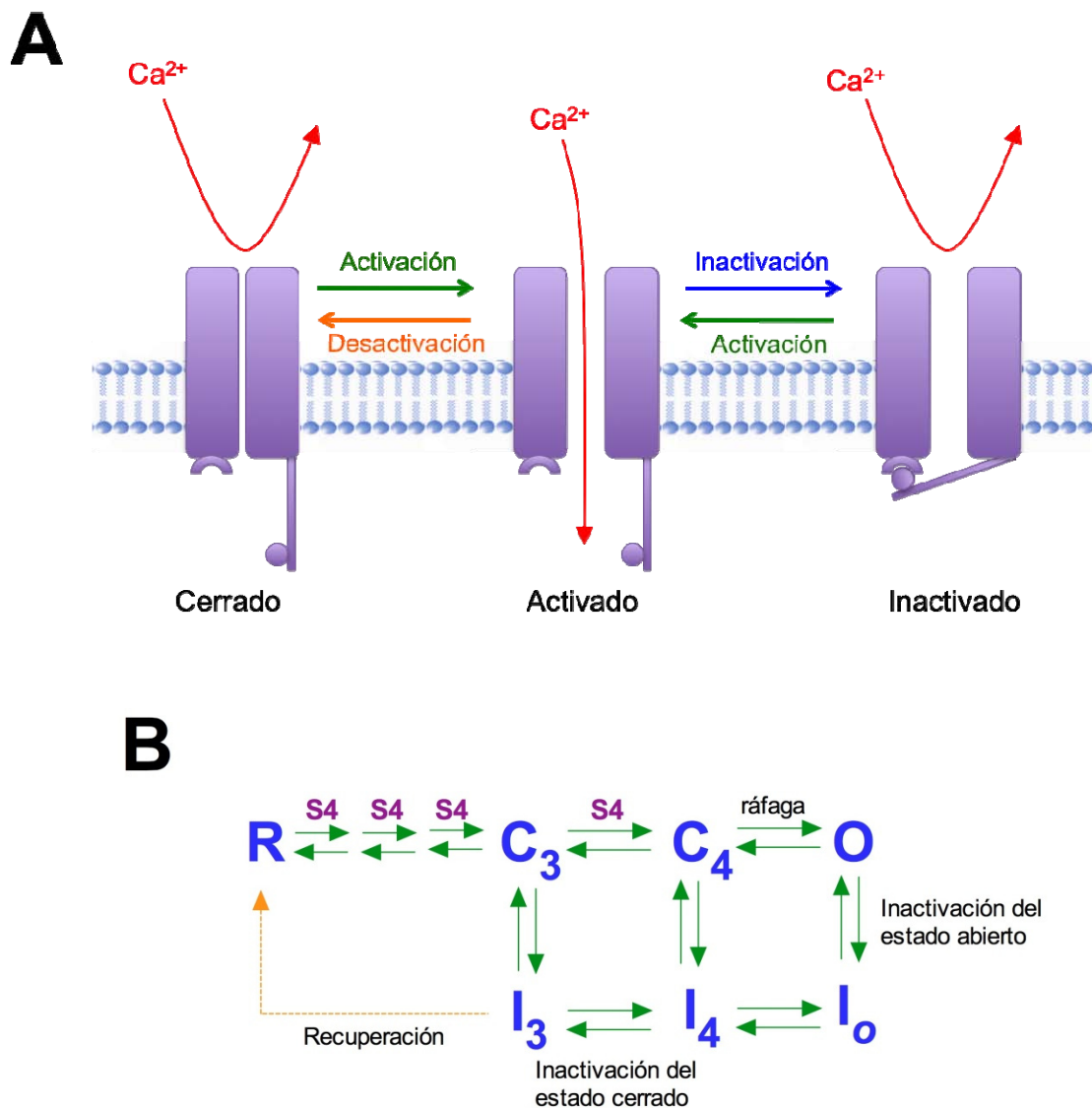


Figura 5. Esquema simplificado del funcionamiento de los canales Ca_v3 . **A)** Representación esquemática de los estados conformacionales que pueden adoptar los canales Ca_v3 . El proceso de Activación es la transición del estado cerrado al estado abierto o activado del canal, en el que sucede el flujo 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; finalmente el proceso de Desactivación es la transición del estado abierto al estado cerrado, es decir, implica el cierre del canal (Adaptada de George, 2005). **B)** Esquema simplificado de la activación de los canales Ca_v3 . El modelo representa transiciones entre los estados de reposo (R), cerrado (C), abierto (O) e inactivado (I). Los cambios en el V_m inducen el movimiento del sensor de voltaje S4, los cuales promueven cambios conformacionales en la proteína del canal. El movimiento de tres de las cuatro regiones S4 es suficiente para inducir estados cerrados que se inactivan relativamente rápido. El estado cerrado proximal (C_4) puede dirigirse a un estado de inactivación (I_4) o conducir a la apertura del canal (O). El estado abierto puede inactivarse (I_0) y transitar a través de estados de inactivación intermedios a la recuperación del estado de reposo. Los efectos de voltaje sugieren que los sensores S4 deben regresar a su posición original antes de que los canales puedan recuperarse de la inactivación (Adaptada de Perez-Reyes, 2003).

manifestar el patrón de ráfaga de nuevo. La rápida apertura y cierre de los canales puede ser modelada como transiciones entre un estado cerrado y un estado abierto. La tasa de transición del estado abierto determina el tiempo medio de apertura el cual fluctúa entre 0.5 a 2 ms. En la **Fig. 5B** se presentan los estados de transición de los canales Ca_v3 .

D. Farmacología de los canales Ca_v3

El entendimiento acerca del funcionamiento de los canales Ca_v ha sido beneficiado notablemente por el uso de una variedad de fármacos que interactúan con uno o más tipos de los canales Ca_v . De hecho, algunas clasificaciones de los canales Ca_v se han realizado con base en su sensibilidad a fármacos, toxinas, e incluso iones inorgánicos (Tabla 1; Heady *et al.*, 2001; Lacinova, 2004). Esto ha sido particularmente útil para los canales HVA, puesto que ellos presentan múltiples tipos de corrientes de calcio (L, P/Q, N y R) que pueden ser diferenciadas por el uso de bloqueadores selectivos tales como dihidropiridinas, ω -agatoxina IVA y ω -conotoxina GVIA (**Tabla 1**). Por el contrario, el estudio de los canales LVA ha sido más complicado por la ausencia de un bloqueador selectivo. A la fecha, solo el níquel (Ni^{2+}) constituye una herramienta farmacológica para poder discriminar los canales $Ca_v3.2$ de $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.3$ (Lee *et al.*, 1999b). El mibefradil, aunque es 10 veces más potente bloqueando canales LVA que HVA, no presenta ninguna especificidad por alguno de los primeros (Gomora *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2000), además de que bloquea con una potencia similar canales de potasio activados por voltaje (Gomora *et al.*, 1999).

Los estudios farmacológicos sobre los canales de calcio LVA en tejidos nativos han arrojado resultados conflictivos, ya que existen variaciones considerables en las concentraciones inhibitorias medias (IC_{50}) reportadas para ciertos agentes bloqueadores de estos canales (Todorovic & Lingle, 1998; Heady *et al.*, 2001; Lacinova, 2004). En la mayoría de los casos, las variaciones se han atribuido a las posibles diferencias en sensibilidad de los tres miembros de la familia Ca_v3 y a las discrepancias génicas entre especie (Lacinova, 2004).

Por ejemplo, los tres miembros de esta familia son bloqueados por concentraciones micromolares y milimolares del ion Ni^{2+} , del cual se ha reportado una IC_{50} de 133 y 1130 μM para el canal $Ca_v3.1$ (Lee *et al.*, 1999b; Lacinova *et al.*, 2000; Monteil *et al.*, 2000a). El canal $Ca_v3.2$ es el más sensible de los tres miembros LVA, con un valor de IC_{50} que va desde 1.9 hasta 12 μM (Lee *et al.*, 1999b; Perchenet *et al.*, 2000). El canal $Ca_v3.3$ es diez veces menos sensible que $Ca_v3.2$ con una IC_{50} de entre 184 y 216 μM (Lee *et al.*, 1999b; Monteil *et al.*, 2000b). Los iones trivalentes de la serie de los lantánidos son más potentes bloqueando canales LVA (IC_{50} s en el orden nanomolar), pero nuevamente no presentan alguna especificidad relevante por alguno de ellos (Beedle *et al.*, 2002).

Desde el punto de vista farmacológico, los canales Ca_v3 han adquirido especial relevancia por estar directamente involucrados en enfermedades como la epilepsia (Gomora *et al.*, 2001; Huguenard, 2004), la hipertensión (Krayenbuhl *et al.*, 1999) y la percepción del dolor (Todorovic & Jevtovic-Todorovic, 2007), entre otras. No obstante, a pesar de que varios fármacos afectan la actividad de los canales Ca_v3 , como por ejemplo, el valproato, la etosuximida, la succinamida, la fenitoína, la lamotrigina, la sipatrigina, así como neurolépticos de la clase de las difenilbutilpiperidinas (Enyeart *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1999; Lacinova *et al.*, 2000; McNaughton *et al.*, 2000a; Todorovic *et al.*, 2000; Gomora *et al.*, 2001), ninguno de ellos muestra una especificidad por los canales tipo T como lo muestran las dihidropiridinas para los canales tipo L. Interesantemente, el compuesto SB-209712, originalmente desarrollado como un antagonista de los canales HVA (Brown & Cooper, 1995), bloquea con mayor efectividad los canales $Ca_v3.3$ con una IC_{50} de 500 nM (McNaughton *et al.*, 2000b), aunque no se ha investigado su efecto en los canales $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$.

2.3. Amilorida

La amilorida es un diurético de tipo ahorrador de potasio, que después de haber sido sintetizado por los laboratorios de investigación Merck Sharp & Dohme's (Bicking *et al.*, 1965), fue aprobado su uso en la clínica en 1967 para el tratamiento de la hipertensión y el fallo cardíaco congestivo. Este compuesto proviene de una serie de síntesis de diuréticos de pirazina (Bicking *et al.*, 1965). Su nombre químico es clorhidrato de

3,5-diamino-N-(aminoiminometil)-6-cloro pirazinocarboxamida dihidratado (**Fig. 6**). La amilorida se comercializa con el nombre de Modiuretic[®], como clorhidrato de amilorida en combinación con hidroclorotiazida en proporción 1/10 (Reyes & González, 2005).

La absorción de la amilorida en el tracto gastrointestinal es rápida y total cuando es administrada de forma oral. Se sabe que este fármaco presenta una biodisponibilidad de aproximadamente el 50%; alcanza su máxima concentración en plasma (~220 nM) a las 2 horas, se une a proteínas plasmáticas en aproximadamente un 40-50%, presenta una vida media de 24 horas, no se metaboliza, y su excreción se lleva a cabo por vía renal sin ninguna alteración de su estructura química (Spahn *et al.*, 1987; Flanagan, 1998; Katzung, 2001; Goodman, 2003).

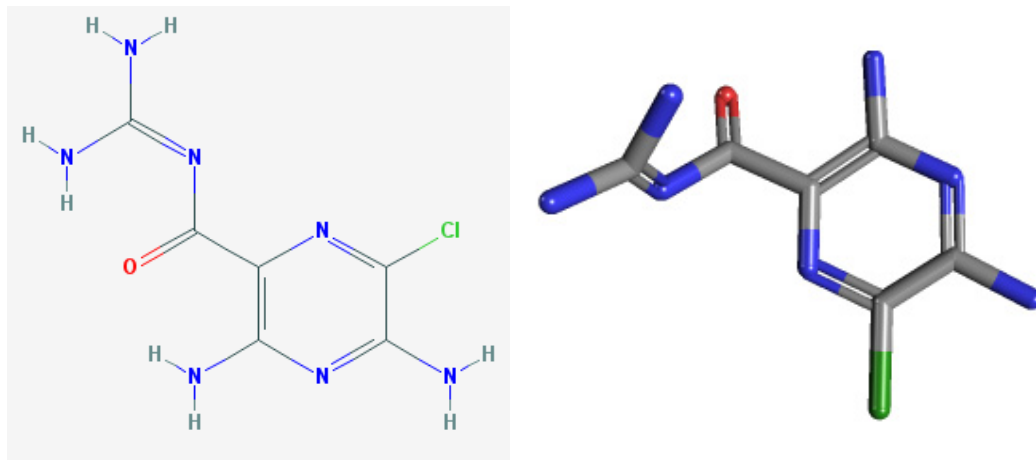


Figura 6. Estructura química de la amilorida. La figura muestra la molécula de amilorida en dos (izquierda) y en tres (derecha) dimensiones. Tomado de *PubChem-Compound ID:16231*.

A. Mecanismo de acción de la amilorida

El efecto diurético de la amilorida es debido al bloqueo directo del canal epitelial de sodio ENaC, por sus siglas en inglés. Con base en datos cristalográficos obtenidos a partir de un canal ASIC de pollo (canales activados por protones) (Jasti *et al.*, 2007), que pertenece a la misma superfamilia de canales de que los ENaC, se sugiere que el canal ENaC es un heterotrímero constituido por subunidades α , β y γ , dichas subunidades se arreglan de forma cuasi-simétrica alrededor del poro central del canal. Cada subunidad está formada

por dos segmentos transmembrana denominados M1 y M2 unidos por una prominente asa extracelular (Benos & Stanton, 1999; Bhalla & Hallows, 2008) (**Fig. 7**). El ENaC se expresa prominentemente en el epitelio del sistema de conductos colectores del riñón y tracto urinario, también está presente en el epitelio pulmonar e intestinal, en los conductos sudoríparos y salivales, así como en algunas células gustativas, excitables, entre otras (Costanzo, 1984; Koeppen, 1986; Duc *et al.*, 1994; Ciampolillo *et al.*, 1996; Garty & Palmer, 1997). En el sistema renal, el ENaC cumple con la función de transporte de iones Na^+ desde la luz del túbulo distal hasta el interior de las células epiteliales que forman las paredes de dichos conductos. Una vez dentro de la célula, los iones Na^+ son transportados a través de la bomba Na^+/K^+ ATPasa presente en la membrana basolateral con dirección hacia los vasos sanguíneos, de este modo existe reabsorción y homeostasis de Na^+ en el organismo (Garty & Palmer, 1997). Por lo tanto, cuando el ENaC es bloqueado por amilorida se promueve la pérdida de Na^+ y agua (por la inhibición del transporte de Na^+ y el efecto osmótico consecuente), pero sin la disminución de iones K^+ en el organismo, de este modo, la amilorida funciona como un diurético ahorrador de K^+ . La concentración de amilorida requerida para bloquear el 50% del transporte de Na^+ a través del ENaC, se encuentra en el intervalo de 0.1 a 1 μM , dependiendo del epitelio y de las condiciones experimentales empleadas (Benos, 1982; Kleyman & Cragoe, 1988; Garty & Palmer, 1997).

Recientemente, el uso de técnicas computacionales validadas con experimentos electrofisiológicos, permitió evaluar la interacción de la amilorida con la estructura modelada por homología del canal ASIC-1 de humano (Qadri *et al.*, 2010). En dicho estudio se definieron sitios de unión entre la amilorida y el ASIC-1, con base al cálculo de valores energéticos de interacción entre el ligando (amilorida) y el receptor (ASIC-1). Este trabajo representa un claro ejemplo de la utilidad de las herramientas computacionales como el acoplamiento molecular o *docking* en la búsqueda de sitios de unión de fármacos dentro de proteínas blanco.

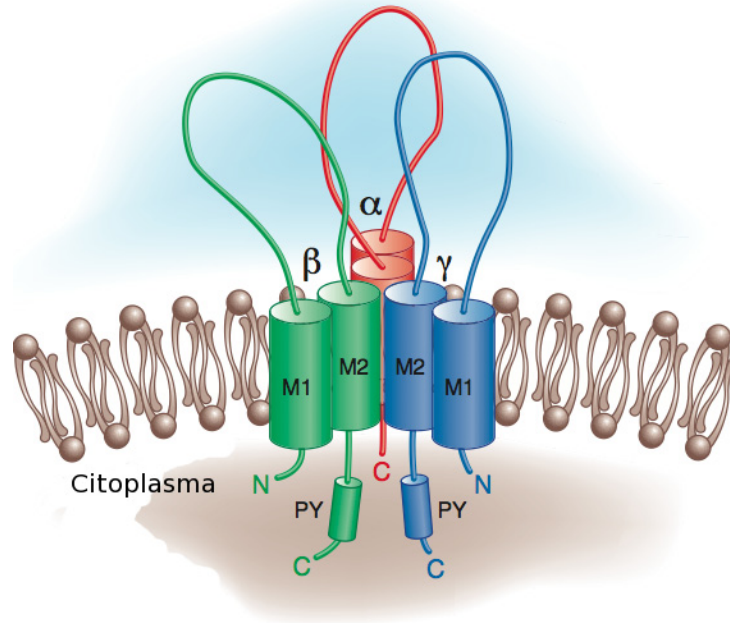


Figura 7. Representación esquemática de la arquitectura espacial propuesta para el ENaC. La figura muestra las características estructurales del canal epitelial de sodio. El ENaC se organiza como un heterotrímero formado por las subunidades α , β y γ . Cada subunidad tiene dos dominios transmembranales (M1 y M2), una prominente asa extracelular que los une y extremos amino y carboxilo intracelulares. Las subunidades β y γ , contienen en un motivo "PY" en su extremo carboxilo, el cual funciona como un motivo regulador del canal (Modificada de Bhalla & Hallows, 2008).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En distintas preparaciones celulares la amilorida ha sido frecuentemente utilizada como herramienta farmacológica para el estudio de las corrientes nativas generadas por los canales Ca_v3 (Tang *et al.*, 1988; Takahashi *et al.*, 1989; Herrington & Lingle, 1992; Huguenard & Prince, 1992; Arnoult *et al.*, 1998; Todorovic & Lingle, 1998); sin embargo, los resultados obtenidos han presentado discrepancias en los valores de IC_{50} , ya que abarcan todo el orden micromolar, y en algunos casos, el milimolar. En otros trabajos se ha investigado el efecto de la amilorida sobre los canales recombinantes $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$, de ratón y de humano, respectivamente (Williams *et al.*, 1999; Lacinova *et al.*, 2000), obteniéndose una IC_{50} de 167 μ M para el canal $Ca_v3.2$, a diferencia de $Ca_v3.1$, en donde concentraciones del orden milimolar bloquean menos del 50% de la corriente de calcio. Para los canales $Ca_v3.3$ no se ha reportado aún ningún valor de IC_{50} o equivalente. Además, ningún trabajo de los mencionados anteriormente ha realizado estudios referentes a la interacción del fármaco con estos canales iónicos, así como tampoco se han realizado estudios sistemáticos para investigar los efectos de la amilorida sobre las propiedades biofísicas de aquellos, el mecanismo de bloqueo, etc., y menos aún se ha intentado identificar los probables sitios de unión de la amilorida con la proteína de los canales Ca_v3 .

Por lo anterior, el presente trabajo de tesis se enfocó a investigar si existe un bloqueo diferencial de cada miembro de la familia Ca_v3 por amilorida y si ésta es la razón de las discrepancias en concentraciones inhibitorias medias reportadas en estudios previos; además, la caracterización del mecanismo de bloqueo, así como la búsqueda de probables sitios de interacción de la amilorida con los canales Ca_v3 fueron objetivos que complementaron la presente investigación.

IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

HIPÓTESIS

1. La amilorida bloquea de manera diferencial a los canales Ca_v3 clonados de humano.
2. El bloqueo diferencial de la amilorida se debe a las diferencias en la secuencia y estructura de los canales Ca_v3 , lo cual genera sitios con diferentes afinidades a la amilorida.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto farmacológico de la amilorida sobre las propiedades biofísicas de los canales Ca_v3 clonados de humano.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la potencia del bloqueo de la amilorida sobre las corrientes generadas por los canales Ca_v3 .
2. Investigar el mecanismo por el cual la amilorida afecta la actividad de los canales Ca_v3 .
3. Realizar estudios de acoplamiento molecular o *docking* para la búsqueda de probables sitios de interacción entre la amilorida y las proteínas de los canales Ca_v3 .

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cultivo celular

En el presente trabajo se utilizaron células HEK-293 que expresan de manera estable a los canales Ca_v3 , dichas células son derivadas de un tumor renal de embrión humano y debido a que no presentan corrientes de calcio endógenas, son un excelente modelo de estudio de los canales Ca_v3 clonados de humano. Las células HEK-293 que expresan establemente la subunidad $Ca_v3.1$ (Número de acceso en el GenBank AF190860; Cribbs *et al.*, 2000), $Ca_v3.2$ (AF051946; Cribbs *et al.*, 1998) y $Ca_v3.3$ (AF393329; Gomora *et al.*, 2002), fueron donadas amablemente por el Dr. Edward Pérez-Reyes de la Universidad de Virginia de los Estados Unidos de América. Las células se crecieron en cajas de Petri de plástico de 100 mm de diámetro bajo condiciones estándar de incubación (95% de O_2 y 5% de CO_2 a 37°C) y una atmósfera saturada de agua. El medio de cultivo utilizado fue DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 UI/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomicina (DMEM completo). La expresión estable de los canales en las células HEK-293 se mantuvo por la adición de 1 mg/ml del antibiótico de selección G-418. Cuando las monocapas celulares presentaban una confluencia de 85 a 95%, 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 las células se despegaron con 1 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 9.0 mL de medio DMEM completo y utilizando pipetas serológicas de 10 mL. Las células se sembraron a una densidad 10 veces menor en una caja Petri nueva en un volumen final de 10 mL de medio DMEM completo. A partir de la misma suspensión celular se tomaron dos alícuotas una de 400 μ L y otra de 200 μ L, cada una de las cuales se sembraron en una caja Petri 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. Cuando la monocapa de células de las cajas de 35 mm alcanzaba una confluencia de 85 a 95%, estas fueron sujetas al mismo procedimiento descrito arriba (escalado

proporcionalmente) para sembrar una alícuota de células en una nueva caja Petri de plástico de 35 mm, cuyo fondo contenía pequeños cubreobjetos de vidrio de aproximadamente 25 mm² de área y 2 mL de medio DMEM completo. Las células sembradas sobre los cubreobjetos de vidrio se mantuvieron durante 2 (mínimo) a 18 (máximo) horas en condiciones de incubación antes de proceder a los registros electrofisiológicos.

5.2. Electrofisiología

A. Soluciones de registro

La composición de la solución externa de registro fue: (en mM) 160 Cloruro de tetraetilamonio (TEA-Cl), 10 HEPES y 5 CaCl₂, pH 7.4 ajustado con TEA-OH. La composición de la solución interna fue: (en mM) 135 CsCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES, pH 7.3 ajustado con CsOH. Con las concentraciones indicadas, la combinación del quelador de calcio EGTA y el CaCl₂ resulta en una concentración de Ca²⁺ libre aproximada de 50 nM de acuerdo al programa *Bound and Determined* (Brooks & Storey, 1992). La solución interna se suplementó con ATP (4 mM) y GTP (0.3 mM) para evitar el posible *rundown* (disminución de la amplitud de la corriente en función del tiempo en la configuración de célula completa) que se ha observado en algunos canales de calcio. Con las presentes condiciones de registro, las corrientes salientes a través de los canales Ca_v3 son acarreadas mayoritariamente por el ión Cs⁺. La amilorida (hidrocloruro hidratado) se obtuvo de Sigma-Aldrich.

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). Para los registros electrofisiológicos sólo se utilizaron pipetas con resistencias de 2 a 3 MΩ 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 (Hamill *et al.*, 1981). 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 almacenadas en una computadora, la cual tiene instalado el software de pClamp versión 9.02. Este software permitió 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. 8**.

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 ~2 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. Sólo aquellas células visualizadas con una membrana íntegra y ausencia de detritus en su periferia fueron seleccionadas para los registros electrofisiológicos.

La condición necesaria para realizar registros con la técnica de *patch clamp* es la obtención de un sello de alta resistencia ($\geq 1 \text{ G}\Omega$) entre la membrana celular y la punta de la pipeta de registro, una vez logrado dicha condición se aplica un potencial de mantenimiento (HP) de -100 mV al interior de la pipeta, y acto seguido se rompe el sello permitiendo una continuidad entre la solución interna de la pipeta y el citoplasma de la

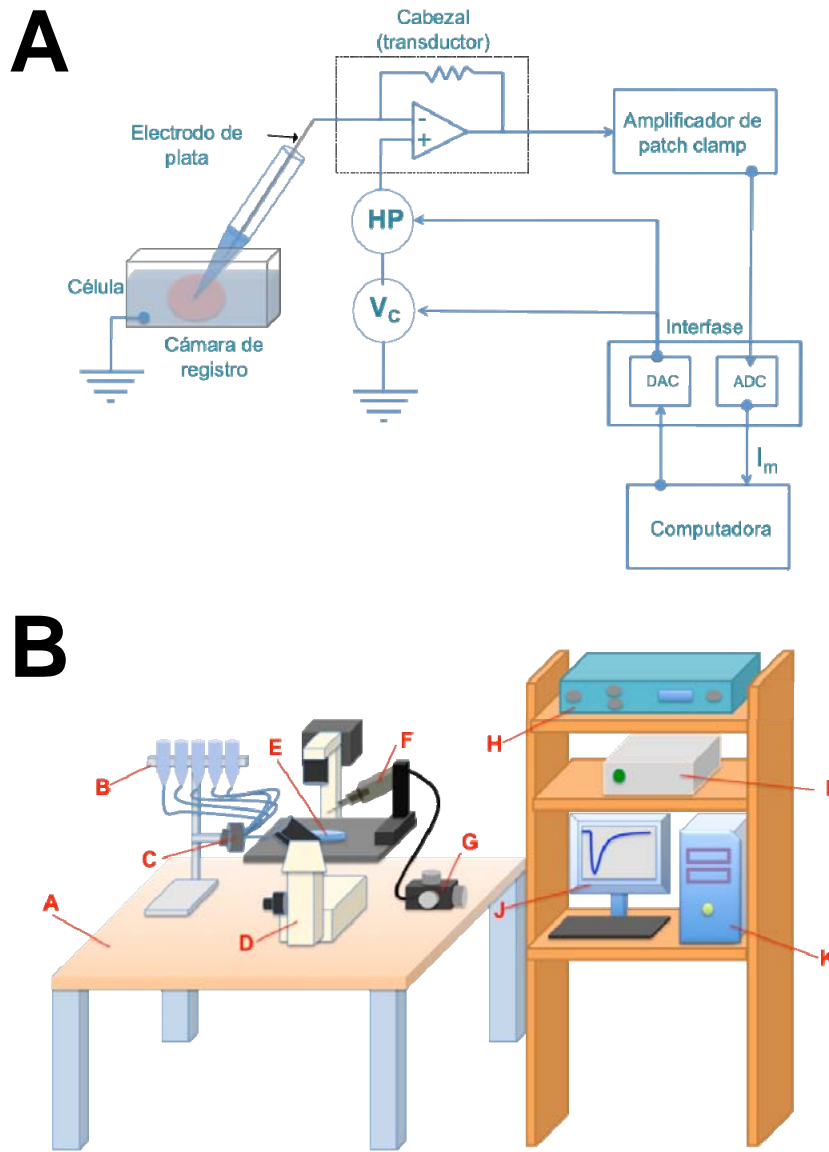


Figura 8. Representación esquemática del sistema de registro electrofisiológico. Las corrientes de calcio generadas por los canales Ca_v3 fueron registradas empleando la técnica de *patch clamp* en la configuración de célula completa. **A)** El amplificador operacional contenido en el cabezal controla 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) se generaron en el convertidor digital-analógico (DAC) de la interfase, mientras que el potencial de mantenimiento (HP) entre cada pulso fue generado 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 (ADC) 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. **B)** El diagrama inferior ilustra el equipo principal que conforma el set up de registro electrofisiológico con la técnica de *patch clamp*. Mesa antivibratoria (A); sistema de perfusión (B); válvula giratoria de seis vías y una salida común (C), microscopio óptico invertido (D), cámara de registro (E), transductor (F), micromanipulador eléctrico (G), amplificador de *patch clamp* (H), interfase –convertidor A/D y D/A (I), monitor (J) y unidad central de procesamiento (K).

célula bajo estudio, a esta modalidad de *patch clamp* se le denomina célula completa; 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 generadas por los canales Ca_v3 .

D. Protocolos de voltaje

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

- ***sp-30150* y *sp-30500***

Este protocolo consiste en la aplicación de un pulso único a -30 mV de 150 ms de duración para $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$, y de 500 ms de duración para $Ca_v3.3$, aplicados cada 10 s (0.1 Hz). Bajo las presentes condiciones de registro, en nuestro laboratorio se ha establecido que la corriente de calcio (I_{Ca}) alcanza su valor máximo alrededor de -30 mV. Por ello, la aplicación de dicho protocolo nos permitió obtener una aproximación de la amplitud máxima de la corriente, así como de la calidad de los registros de la célula bajo estudio.

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

El protocolo *IV* consistió en la aplicación de una familia de pulsos despolarizantes desde -80 y hasta +80 mV en incrementos de 10 mV, aplicados con una frecuencia de 0.1 Hz. Los registros de corriente así evocados sirvieron para construir las curvas corriente-voltaje (*I-V*) y analizar la cinética de la I_{Ca} .

- ***Hinf10ms-100* y *Hinf15-100i***

Este protocolo fue diseñado para determinar la inactivación en el estado estacionario de los canales Ca_v3 ; consistió de dos pulsos de voltaje, el primero de ellos fue un prepulso que llevó el potencial de membrana (V_m) a diferentes valores (desde -110 hasta -45 mV)

durante periodos de 10 s ($Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$) o 15 s ($Ca_v3.3$) cada uno. El segundo, fue un pulso de prueba a -30 mV por un tiempo de 200 ms ($Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$) o 500 ms ($Ca_v3.3$).

- ***iiv2ms60-2ch* e *iiv10ms60-2ch***

Este protocolo también consistió de dos pulsos de voltaje y se aplica para obtener información referente a la curva $I-V$ instantánea. En este caso, el primer pulso fue una breve despolarización (2 o 10 ms) a +60 mV para activar prácticamente a todos los canales presentes en la membrana plasmática; mientras que el segundo pulso tuvo la función de repolarizar el V_m a diferentes voltajes desde -120 hasta +80 mV en incrementos de 10 mV con una duración de 25 y 40 ms cada uno de ellos. Los pulsos de menor duración se aplicaron a los canales $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$, mientras que los de mayor duración a $Ca_v3.3$. La información relevante de este protocolo se obtiene de las colas de corriente que se generan al repolarizar la membrana a los potenciales mencionados y que reflejan el cierre de los canales abiertos por el pulso a +60 mV. Al realizar el gráfico de 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 el ajuste de las mismas con funciones exponenciales indica el curso temporal con el que se cierran dichos canales.

- ***Recover-100* y *Recover-100i***

Este protocolo consistió en la aplicación de dos pulsos de voltaje a -30 mV desde un HP de -100 mV. La duración del primero fue de 100 o 500 ms (nuevamente dependiendo el tipo de canal), mientras que el segundo tuvo una duración de 20 o 50 ms. El intervalo de tiempo que separó la aplicación de ambos pulsos varió desde 0.01 hasta 25 s. La importancia de este protocolo radica en que proporciona información temporal acerca de la recuperación a partir de la inactivación del canal, misma que se obtiene al graficar la corriente normalizada en función del tiempo que separa ambos pulsos.

- ***BCS***

Finalmente, el sexto 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 del fármaco con la conformación cerrada del canal.

La calidad de los resultados que se obtienen con 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 30 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 los registros, la corriente de fuga (corriente que se escapa a través del sello entre la punta del electrodo de registro y la membrana de la célula) asociada a la configuración de célula completa se realizó *off-line* (es decir, hasta que se analizaron 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/-4, y el otro para registrar la corriente cruda sin ninguna modificación. 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 la velocidad con la que se lleva a cabo el cierre de los canales Ca_v3 (constante de tiempo de ~1-3 ms), por lo que el corte de frecuencias debe disminuirse con la finalidad de tener 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 2008 (Microsoft Corporation, EUA) y Prism 5.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, EUA).

Para evaluar la potencia de la amilorida sobre cada miembro de los canales Ca_v3 , se determinó el efecto de concentraciones crecientes de dicho fármaco sobre la amplitud de la I_{Ca} registrada a -30 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 de amilorida. Los datos experimentales obtenidos de este modo se ajustaron con la ecuación de Hill incluida en el programa Prism 5.0:

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

donde X es el logaritmo de la concentración de amilorida, y es la fracción de corriente remanente después de la adición del fármaco, IC_{50} es la concentración de amilorida necesaria para abatir el 50 % de la I_{Ca} inicial, y h es el coeficiente de Hill 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:

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

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 primero se obtuvo el valor de τ de activación, y con el segundo el de la τ de inactivación.

Los datos de inactivación en el estado estacionario de los canales Ca_v3 se ajustaron con una función Boltzmann como la siguiente:

$$I_{Ca} = \frac{I_{\max}}{1 + \exp\left(\frac{V_m - V_{1/2}}{k}\right)} \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde I_{Ca} es la fracción de la corriente inactivada al voltaje en cuestión, $V_{1/2}$ es el voltaje al cual se inactiva la mitad de los canales disponibles, V_m es el potencial de membrana y k es una medida de la tasa de cambio con la que los canales se inactivan en función del voltaje.

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:

$$\tau_{ponderada} = A_1\tau_1 + A_2\tau_2 \quad (\text{Ecuación 4})$$

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 (SEM) de los valores obtenidos en diferentes células. La comparación entre las medias 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.

5.3. Modelado y acoplamiento molecular

Las estructuras en tres dimensiones de los miembros de la familia Ca_v3 fueron obtenidos a partir de modelado por homología mediante *MODELLER* (Fiser & Sali, 2003) usando como molde a los canales de potasio que a la fecha cuentan con estructura cristalina de alta resolución encontradas en la base de datos de proteínas (PDB) con los siguientes códigos: 1K4C (Zhou *et al.*, 2001), 3NLM (Ji *et al.*, 2010), 1BL8 (Doyle *et al.*, 1998). Además, el metaservidor *I-Tasser* (Roy *et al.*, 2010) fue empleado para obtener los modelos *ab initio* de dominio del poro de los canales Ca_v3 . El software PyMOL versión 0.99 (DeLano Scientific) se utilizó para extraer un monómero a partir de la estructura tetramérica del canal 1K4C. Por otra parte, el software MGL Tools versión 1.5.2 (Sanner, 1999) fue usado para asignar las cargas de Gasteiger de la proteína y para generar el archivo estructural que se empleó para el acoplamiento molecular. Finalmente, el acoplamiento molecular o *docking* se llevó a cabo con el software Autodock/Vina versión 1.0 (Trott & Olson, 2010), el cual permitió predecir los sitios potenciales de unión y el modo de interacción de la amilorida sobre los modelos estructurales del dominio del poro de los canales Ca_v3 . La estructura de la amilorida se obtuvo a partir de la colección virtual de

ligandos de la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>). De cada combinación canal/ligando se obtuvieron 36 posiciones de *docking*, con valores mínimos de energía de unión (en kcal/mol) y distancia promedio (en Angstroms). La interacción receptor-ligando fue visualizada y analizada utilizando el programa PyMOL versión 0.99.

VI. RESULTADOS

6.1. Efecto farmacológico de la amilorida

A. Bloqueo diferencial de los canales Ca_v3 por amilorida

Para determinar de manera cuantitativa el efecto de la amilorida sobre las corrientes generadas por los canales Ca_v3 , en primer lugar se procedió a evaluar el bloqueo estacionario de la I_{Ca} . Para ello, se aplicaron pulsos despolarizantes a -30 mV de 150 ms de duración, para los miembros $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$, y de 500 ms para $Ca_v3.3$, en ambos casos se utilizó un HP de -100 mV y con una frecuencia de 0.1 Hz. En la **Fig. 9** se presenta un resumen de estos experimentos; en el panel **A** se ilustran trazos de la I_{Ca} registrada a -30 mV de células HEK-293 que expresan establemente canales $Ca_v3.1$ (trazos azules), $Ca_v3.2$ (trazos verdes) y $Ca_v3.3$ (trazos rojos). En respuesta a cada despolarización se observa una deflexión hacia valores negativos de la señal de corriente (el valor cero de corriente se indica con la línea punteada), dicha deflexión es indicativa de una corriente entrante (los iones Ca^{2+} están entrando a la célula). Poco tiempo después del inicio del pulso despolarizante (algunos milisegundos), la señal de corriente alcanza un valor máximo (corriente al pico, I_{pico}), y justo después de este máximo, la señal de corriente disminuye en amplitud hasta alcanzar prácticamente el valor de cero de corriente después de un periodo de tiempo más largo. Estos dos procesos son característicos de varios tipos de canales dependientes de voltaje, incluyendo los canales Ca_v3 , y se conocen, en orden de aparición, como activación e inactivación. Aproximadamente 2 min después de haber establecido la configuración de célula completa y una vez que se observó que la amplitud de la I_{Ca} generada con cada pulso despolarizante no presentaba variaciones entre los pulsos (es decir, alcanzaba un valor de amplitud estacionario), se comenzó la perfusión de amilorida disuelta en la solución externa de registro. La concentración más baja de amilorida que se utilizó fue 0.03 mM, y una vez que se alcanzó un bloqueo estacionario, se procedió con la perfusión de la siguiente concentración en orden creciente, y así sucesivamente hasta llegar a la concentración más alta investigada, que fue 3 mM (para los tres canales). Después de obtener el bloqueo estacionario de la I_{Ca} en presencia de 3 mM de amilorida, se procedió a realizar el lavado, es decir, reiniciar la perfusión de la solución externa de registro sin amilorida. El curso temporal del bloqueo

de los canales Ca_v3 por la adición de concentraciones crecientes de amilorida se presenta en la **Fig. 9B**. Como se puede observar en los resultados de este experimento, el efecto de la amilorida sobre la amplitud de la I_{Ca} de los canales Ca_v3 se caracterizó por ser un bloqueo dependiente de la concentración.

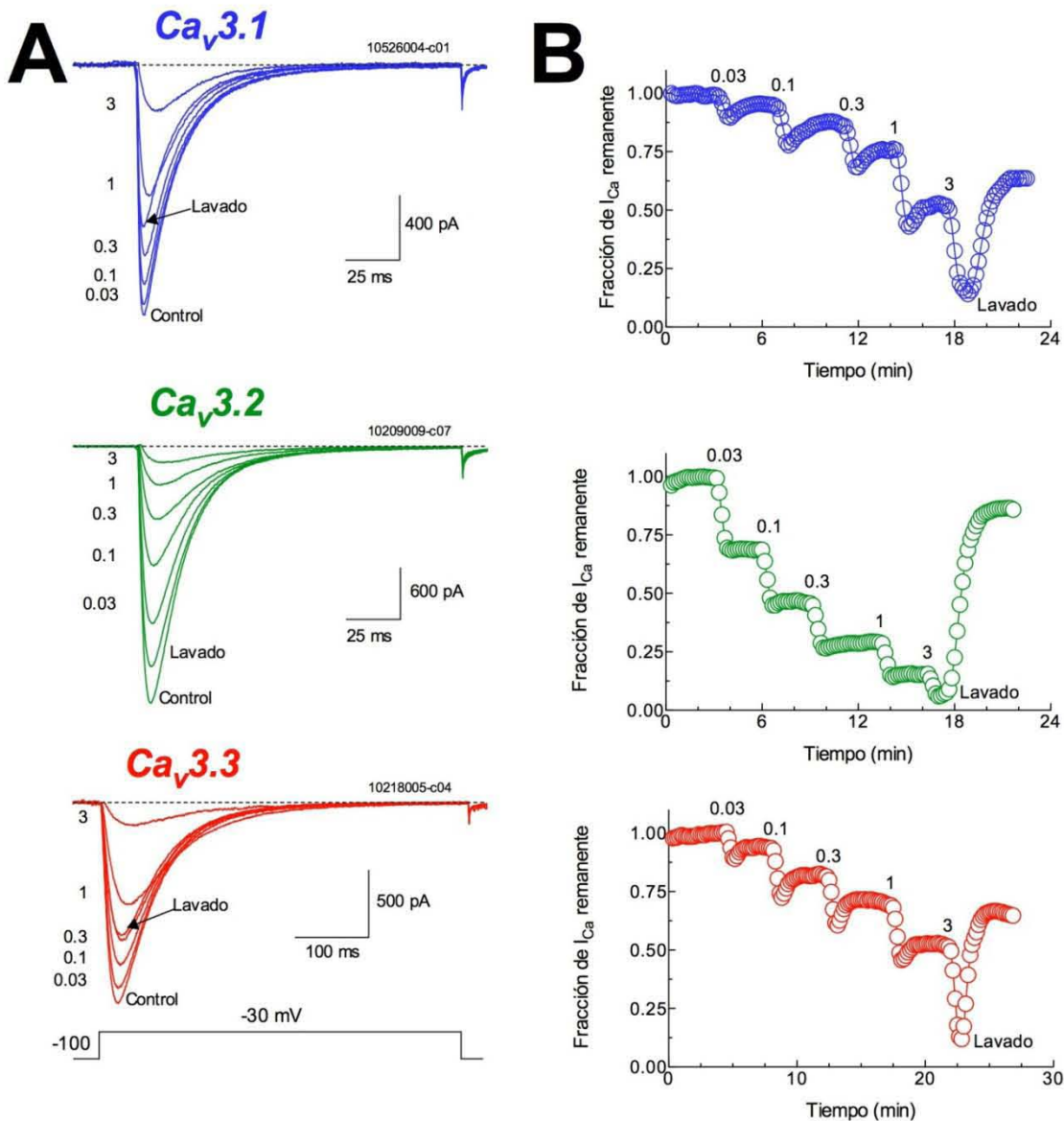


Figura 9. La amilorida bloquea los canales Ca_v3 expresados en células HEK-293. **A)** Trazos representativos de corrientes de calcio a -30 mV de los canales Ca_v3 indicados; en ausencia (Control), en presencia de 0.03, 0.1, 0.3, 1 y 3 mM de amilorida, y después de retirar la amilorida (Lavado) de la cámara de registro. **B)** Curso temporal del bloqueo de la I_{Ca} normalizada con respecto al control de las mismas células mostradas en **A**. Los puntos experimentales son la amplitud normalizada al pico de la I_{Ca} a -30 mV en las diferentes condiciones experimentales indicadas, lo cual se definió como la *fracción de I_{Ca} remanente*.

La fracción de corriente bloqueada (calculada a partir de los resultados presentados en la **Fig. 9**) fue normalizada con respecto a la amplitud de corriente inicial (Control), y se construyó una curva Concentración-Respuesta para el bloqueo de los canales Ca_v3 por amilorida, en el que se graficó el porcentaje de I_{Ca} remanente en función del logaritmo de la concentración de amilorida (**Fig. 10**). En este gráfico se puede apreciar que la actividad de los canales Ca_v3 recombinantes disminuye en función de la concentración de amilorida. Así mismo, se puede notar que el canal $Ca_v3.2$ (círculos verdes) presenta mayor sensibilidad a la amilorida que los otros miembros de la familia Ca_v3 . Los datos experimentales fueron ajustados con la ecuación de Hill (líneas continuas), a partir de los cuales se obtuvo la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) y el coeficiente de Hill para cada uno de los canales Ca_v3 .

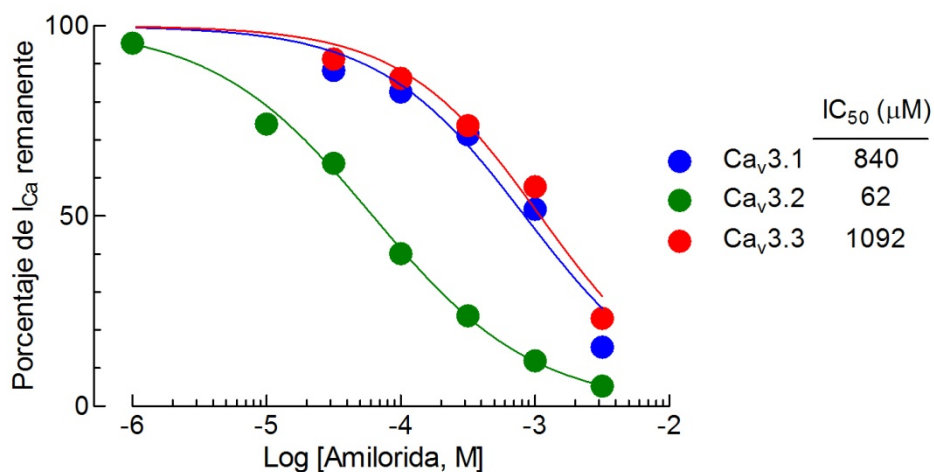


Figura 10. Curvas concentración-respuesta del bloqueo de canales Ca_v3 por amilorida. Los datos se obtuvieron de experimentos como los mostrados en la **Fig. 9**. Se grafica el promedio \pm SEM de 24 a 31 células estudiadas, para cada una de las concentraciones estudiadas. Las líneas que unen los puntos son el ajuste de los datos con la ecuación de Hill, cuyos valores fueron -0.79, -0.72 y -0.84 para $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$, respectivamente

En todos los casos el coeficiente de Hill (h , parámetro que define las proporciones cuantitativas de interacción entre los elementos implicados), presentó valores menores a la unidad, lo que sugiere una relación de interacción con más de un sitio entre la amilorida y la proteína del canal. Por otra parte, la comparación de los valores de IC_{50} mostrados en la **Fig. 10** permite concluir que el canal $Ca_v3.2$ es el miembro más sensible de la familia

Ca_v3 a la amilorida, puesto que las corrientes generadas por Ca_v3.2 son inhibidas por concentraciones 13 y 17 veces más bajas que las requeridas para bloquear un porcentaje similar de las corrientes generadas por los canales Ca_v3.1 y Ca_v3.3, respectivamente. La diferente sensibilidad a la amilorida que presentan los miembros de la familia Ca_v3 puede ser debida a diferencias estructurales entre estas proteínas, propiedades intrínsecas que favorecen la formación de sitios de interacción con el fármaco con diferentes grados de afinidad.

B. Efecto de la amilorida en la activación dependiente de voltaje de los canales Ca_v3.

La relación corriente-voltaje (*I-V*) de los canales Ca_v3 se exploró mediante la aplicación de los protocolos descritos como *IV-100* e *IV-500* (ver Materiales y Métodos), en ausencia y presencia de amilorida. Ejemplos de registros de familias de corrientes obtenidas en respuesta a dichos protocolos de voltaje en células HEK-293 que expresan los canales Ca_v3 se ilustran en la **Fig. 11A**. En la parte media inferior se esquematiza el protocolo utilizado. La única diferencia estribó en la duración de los pulsos despolarizantes, los cuales fueron de 100 ms cuando se estudiaron los canales Ca_v3.1 y Ca_v3.2, y de 500 ms cuando se analizó Ca_v3.3. Esto se debe a que Ca_v3.3 es un canal con una cinética de activación y de inactivación considerablemente más lenta que la de Ca_v3.1 y Ca_v3.2 (Perez-Reyes, 2003). La frecuencia de los pulsos despolarizantes fue de 0.1 Hz, lo cual permite que los canales inactivados durante la despolarización del V_m se recuperen de ésta y estén disponibles para ser activados nuevamente con el siguiente pulso. El protocolo se aplicó en ausencia (Control) y en presencia de 1, 0.1 y 2 mM de amilorida para los canales Ca_v3.1, Ca_v3.2 y Ca_v3.3, respectivamente. Las concentraciones de amilorida usadas en este y los siguientes experimentos fueron ligeramente mayores a la IC₅₀ calculada para cada miembro de la familia Ca_v3 (**Fig. 10**), esto con la finalidad de obtener una inhibición mayor al 50% de la I_{Ca} y estudiar con mayor detalle las posibles modificaciones de las propiedades biofísicas del canal inducidas por el fármaco.

El comportamiento general de las corrientes generadas por los tres canales Ca_v3 consiste en un incremento en la cinética de las mismas conforme la despolarización es más positiva. Esta característica produce un patrón típico, denominado “criss-crossing”

(entrecruzamiento), en el que los registros de corriente cruzan por encima de los anteriores (**Fig. 11A**), y es debido a la rápida y casi total inactivación de los canales Ca_v3 (Perez-Reyes, 2003). En las familias de corriente de la **Fig. 11A** también se puede observar que después de alcanzar un valor máximo de corriente a -30 mV (en los trazos Control), la corriente cambia de dirección, de entrante a saliente, a valores de V_m muy positivos; es decir, en un intervalo de voltajes los canales conducen corriente hacia fuera de la célula (visto como una deflexión hacia valores positivos de la señal de corriente) en lugar de hacerlo hacia el interior de la misma. En las condiciones de registro empleadas en este trabajo de tesis, las corrientes entrantes son generadas por los iones Ca^{2+} (5 mM), mientras que las corrientes salientes son generadas por los iones Cs^+ (135 mM) contenidos en la solución interna de registro, puesto que a dichos voltajes existe una fuerza impulsora más grande para la salida del Cs^+ que para el Ca^{2+} .

El efecto visual más evidente de la amilorida sobre la actividad de los canales Ca_v3 consistió en una disminución importante de la amplitud de las corrientes entrantes, mientras que la amplitud de las corrientes salientes no se afecta de manera importante (**Fig. 11A**, trazos en presencia de amilorida). Esta observación sugiere que la amilorida podría estar actuando como un bloqueador de poro del canal. Un efecto adicional y específico de la amilorida sobre los canales $Ca_v3.3$ fue que en su presencia el voltaje al cual se obtiene el pico máximo de la curva $I-V$ fue -20 mV, es decir, indujo un desplazamiento de 10 mV en relación con la condición Control (**Fig. 11A**, trazos rojos). Con la finalidad de hacer un análisis más cuantitativo de estos resultados, para cada célula estudiada, la corriente máxima registrada a cada valor de V_m se dividió entre el valor de capacitancia de la membrana (C_m), para obtener un valor de densidad de corriente (pA/pF) a cada voltaje explorado. De este modo se evita que el tamaño de las células estudiadas sea una variable. Con los valores de densidad de corriente promediados para cada condición experimental se construyeron las curvas $I-V$ de la **Fig. 11B** (paneles de la izquierda). En los tres miembros de la familia Ca_v3 , la I_{Ca} comienza a ser detectable alrededor de -70 mV, luego aumenta su amplitud conforme se despolariza el V_m , hasta alcanzar un pico máximo, que bajo las presentes condiciones experimentales se presentó a -30 mV.

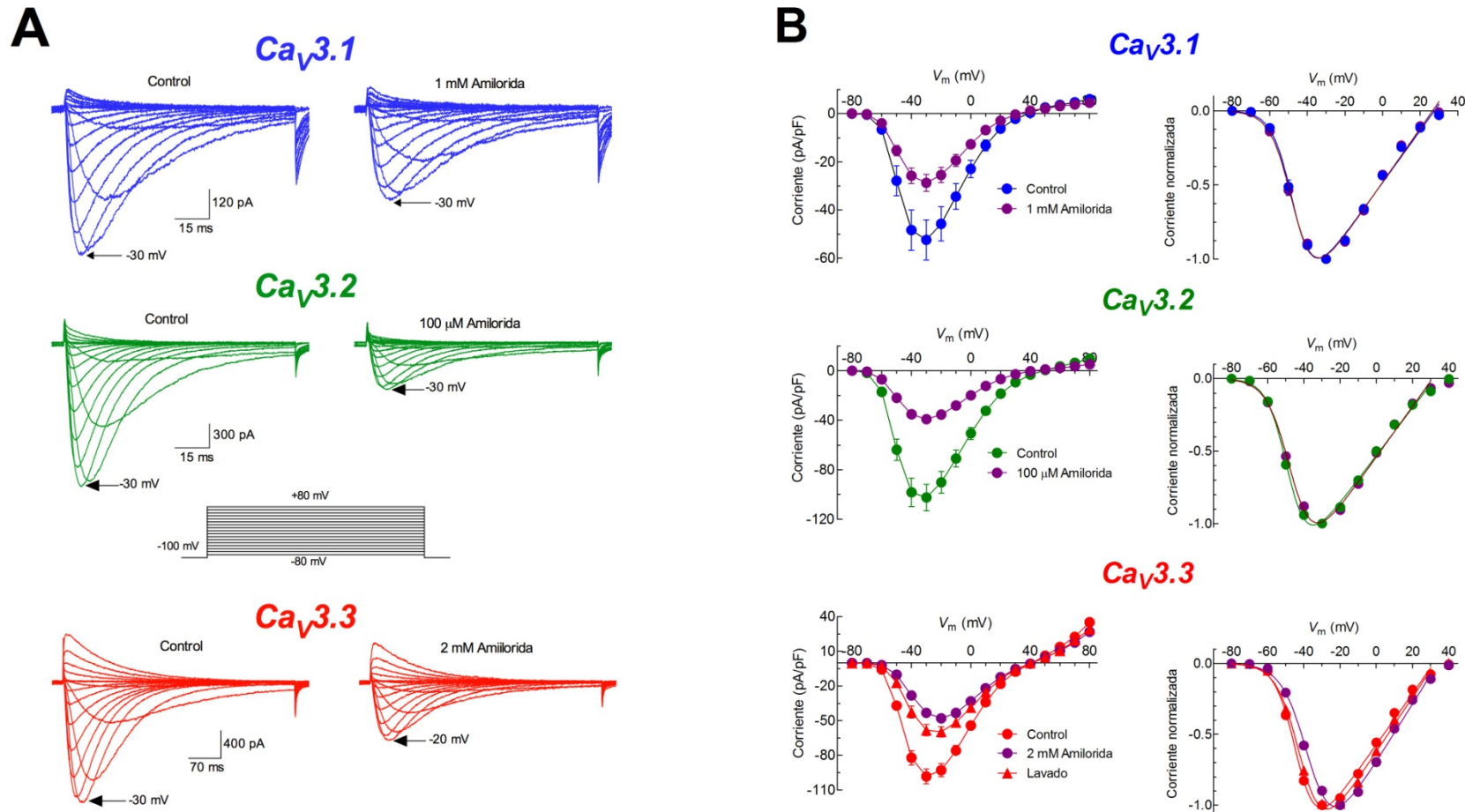


Figura 11. Efecto de la amilorida sobre la relación corriente-voltaje de los canales Ca_v3. Las corrientes de los canales Ca_v3 fueron activadas por pulsos de prueba entre -80 y +80 mV (en escalones de 10 mV) aplicados a una frecuencia de 0.1 Hz antes y después de la exposición a amilorida a las concentraciones indicadas, a partir de un HP de -100 mV. **A)** Ejemplos de familias de corrientes generadas por canales Ca_v3 bajo condiciones Control (*izquierda*) y en presencia de Amilorida (*derecha*). El protocolo de voltaje se muestra como inserto entre los registros de Ca_v3.2 y Ca_v3.3. **B)** Relaciones corriente voltaje (*I-V*) de los canales Ca_v3. Las amplitud al pico de cada uno de los registros como los mostrados en **(A)** de 11 a 19 células fueron promediadas y graficadas en función del V_m (graficas de la *izquierda*). Los valores se muestran como el promedio ± SEM. Estos datos fueron normalizados con respecto al pico máximo de corriente observado en cada célula, promediados y graficados en función del V_m (graficas de la *derecha*). En estas últimas, las líneas continuas que unen los puntos normalizados son el ajuste con la ecuación de Boltzmann modificada, cuyos parámetros se presentan en la **Tabla 2**.

Justo después de este punto y con una mayor despolarización del V_m , la corriente de calcio tiende a disminuir, y cambia de dirección, de entrante a saliente, a potenciales entre +30 y +40 mV. El valor de V_m donde la amplitud de la corriente es igual a cero, se conoce como potencial de inversión o V_{rev} . A voltajes más positivos que éste, se pueden apreciar las corrientes salientes generadas por los mismos canales Ca_v3 pero acarreadas por el ion Cs^+ . Estas curvas $I-V$ muestran que el efecto principal de la amilorida sobre los canales Ca_v3 consiste en una disminución (bloqueo) de la amplitud de las corrientes entrantes. Un efecto adicional que se debe hacer notar es que el pico de la curva $I-V$ para el canal $Ca_v3.3$ presento un desplazamiento hacia valores de V_m más positivos, (comparar las curvas $I-V$ Control, Amilorida y Lavado en el gráfico de $Ca_v3.3$ de la **Fig. 11B**), dicha modificación no se presentó para el caso de los canales $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$. Con la finalidad de cuantificar la observación anterior, los datos de densidad de corriente obtenidos para cada canal bajo cada condición experimental fueron normalizados con respecto a la amplitud máxima de corriente y después ajustados con una función de Boltzmann modificada que considera la fuerza impulsora para el flujo de corriente iónica (ver Métodos). Los resultados se ilustran en el costado derecho de la **Fig. 11B**, donde los mejores ajustes con dicha ecuación se representan con las líneas continuas que unen los puntos experimentales. Los parámetros relevantes de los ajustes matemáticos son $V_{1/2}$, k , y V_{rev} , mismos que se presentan en la **Tabla 2**. El parámetro $V_{1/2}$ indica el valor de V_m al cual se alcanza la activación del 50% de la corriente máxima, mientras que el factor k determina la pendiente de la relación $I-V$.

Tabla 2. Parámetros obtenidos de los ajustes de las curvas $I-V$ con funciones Boltzmann.

	$Ca_v3.1$		$Ca_v3.2$		$Ca_v3.3$	
	$V_{1/2}$	k	$V_{1/2}$	k	$V_{1/2}$	k
Control	-47.8 ± 0.8	4.8 ± 0.1	-48.9 ± 0.7	5.1 ± 0.1	-44.0 ± 0.4	5.3 ± 0.1
Amilorida	-47.7 ± 0.7	$5.3 \pm 0.1^*$	-47.3 ± 0.8	$5.9 \pm 0.1^*$	$-37.1 \pm 0.5^*$	$6.6 \pm 0.1^*$
Lavado	ND	ND	ND	ND	-40.5 ± 1.3	6.0 ± 0.2

Los valores se expresan en mV. Las diferencia significativamente diferentes entre las condiciones Control y Amilorida se indican con un (*) con un valor de $P < 0.01$.

Como se muestra en la **Tabla 2**, los valores de $V_{1/2}$ de los ajustes de las curvas I - V normalizadas en presencia de Amilorida para el caso de los canales $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$ no difieren significativamente con respecto a la condición Control. Por el contrario, en presencia de amilorida el $V_{1/2}$ de la curva I - V de los canales $Ca_v3.3$ sufre un desplazamiento de 7 mV hacia voltajes más positivos, con respecto a la condición Control; por su parte el valor de k también cambio en 1.2 mV, sugiriendo que en presencia de amilorida los canales $Ca_v3.3$ requieren de un mayor voltaje para generar las misma cantidad de corriente que en la condición control. Los cambios de V_{rev} no sufrieron cambios sustanciales, indicando que la amilorida no modifica la selectividad de los canales Ca_v3 .

C. Efecto de la amilorida sobre la cinética de activación, inactivación y desactivación de los canales Ca_v3

El efecto de la amilorida sobre la cinética de activación e inactivación de los canales Ca_v3 se analizó utilizando registros de corriente como los que se exhiben en la **Fig. 11A**. Cada registro de corriente fue ajustado con dos funciones exponenciales, una para la activación y otra para la inactivación. Con los valores de las constantes de tiempo de activación y de inactivación obtenidas con dichos ajustes se construyeron gráficos en función del V_m (**Fig. 12**). La primera conclusión que se obtiene al inspeccionar los gráficos de la **Fig. 12** es que la cinética de las corrientes de los canales Ca_v3 es fuertemente dependiente de voltaje, sobre todo dentro del intervalo de -50 a -20 mV; a voltajes más positivos los valores de las constantes de tiempo no sufren cambios importantes, es decir, la cinética de las corrientes se hace insensible a los cambios de voltaje (entre -10 y +20 mV). De hecho la inactivación de los tres canales es independiente del voltaje a partir de -40 y hasta +20 mV. En segundo lugar, el análisis de cada uno de los canales muestra que $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$ no sufrieron modificaciones importantes en su cinética de activación y de inactivación (**Fig. 12A y B**), ya que en ausencia y en presencia de amilorida los valores de las constantes de tiempo de cada proceso fueron muy semejantes. Por el contrario, los procesos de activación e inactivación del canal $Ca_v3.3$ bajo la presencia de amilorida sucedieron con una mayor lentitud, lo cual se manifestó como incrementos cercanos al 50% en los valores de las constantes de tiempo de ambos procesos, aunque esto fue más acentuado en la activación de la corriente (**Fig. 12C**, inserto panel izquierda).

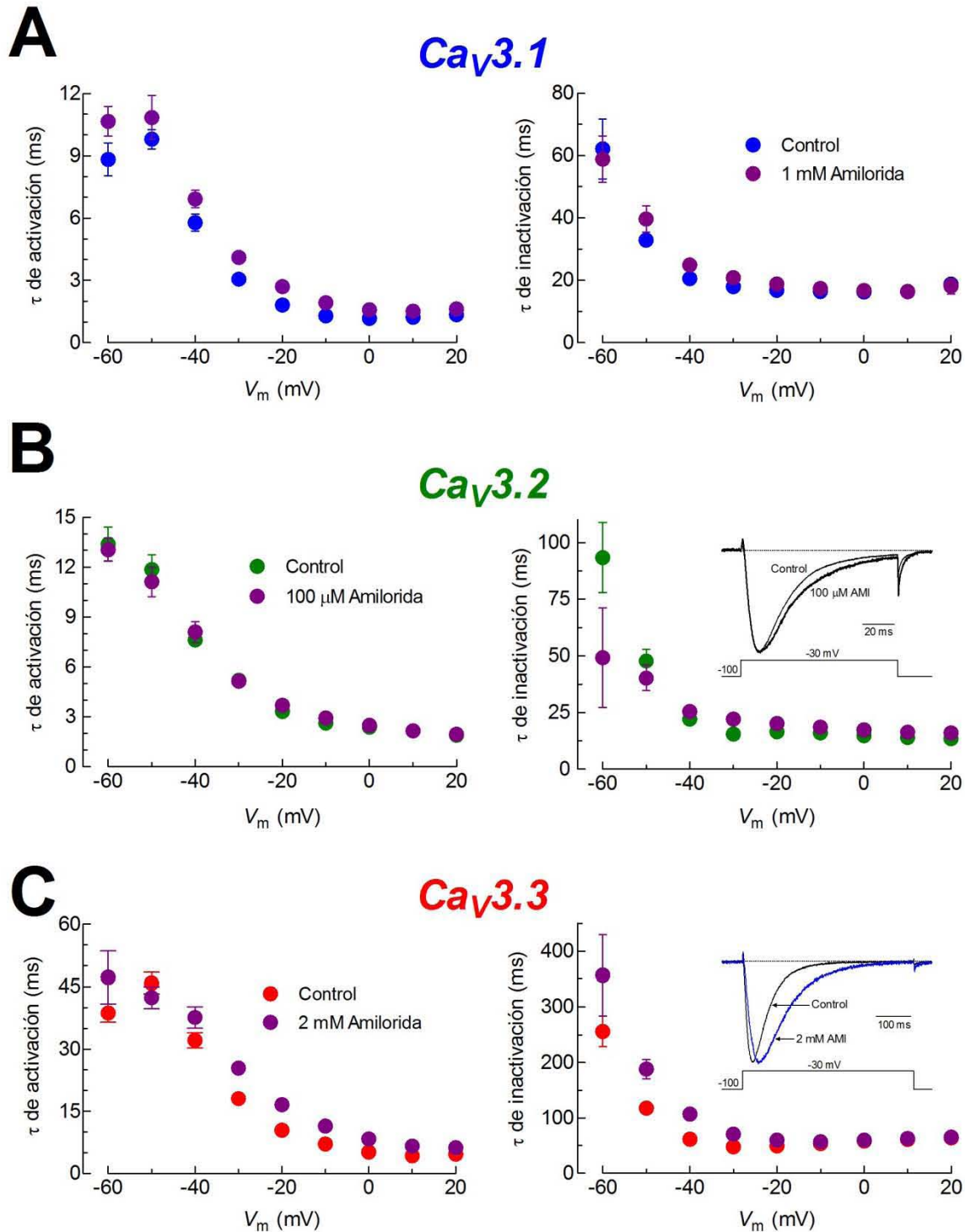


Figura 12. Influencia de la amilorida sobre la cinética de activación e inactivación de los canales Ca_V3 . Dependencia al voltaje de las constantes de tiempo de la activación (*izquierda*) y de la inactivación (*derecha*) bajo condiciones Control y en presencia de Amilorida a las concentraciones indicadas, para los canales $Ca_V3.1$ (**A**), $Ca_V3.2$ (**B**) y $Ca_V3.3$ (**C**). Trazos de corriente como los mostrados en la **Fig. 11A** fueron ajustados con una función biexponencial y las constantes de tiempo resultantes (una para la activación y otra para la inactivación) se graficaron en función del V_m . Los datos son el promedio \pm SEM. Los insertos en **B** y **C** ilustran los efectos de la amilorida sobre las corrientes a -30 mV.

El efecto de la amilorida sobre la cinética de desactivación (cierre) de los canales Ca_v3 se evaluó mediante la aplicación del protocolo de la $I-V$ instantánea, a partir del cual se obtuvieron registros de colas de corriente de Ca^{2+} como las que se presentan en la **Fig. 13A**. A pesar de que los registros de corriente se obtuvieron de células transfectadas con un solo canal Ca_v3 y que la contribución de cualquier otro canal endógeno de las células HEK-293 es prácticamente despreciable en la amplitud de las colas de corriente, éstas no fueron ajustadas adecuadamente por una sola función exponencial, como cabría esperar para el cierre de una población homogénea de canales. Este fenómeno se observó en los tres tipos de canales tipo T, aunque fue más evidente para las colas de corriente generadas por los canales $Ca_v3.3$. La explicación a este fenómeno no ha sido aclarada a la fecha, a pesar de que varios autores ya la han descrito (Frazier *et al.*, 2001; Gomora *et al.*, 2002). Por lo tanto, las colas de corriente fueron mejor ajustadas con la suma de dos funciones exponenciales, con cuyos parámetros se calculó una tau ponderada (ver Materiales y Métodos) a cada uno de los diferentes valores de V_m explorados. El resumen de dichos resultados se presenta en la **Fig. 13**. En el panel **A** se ilustran ejemplos de colas de corriente generadas por los canales $Ca_v3.3$ en condiciones Control, Amilorida y Lavado. Para mayor apreciación de la cinética de las colas de corriente solo se presentan las registradas al repolarizar la membrana a -120, -100 y -80 mV. Además, como se ilustra en el protocolo de voltaje (trazado al pie de los registros en presencia de amilorida), solo se muestran los últimos 1.8 ms (de 10) del pulso despolarizante a +60 mV y los primeros 9 ms (de 40) de la repolarización. En todos los casos el HP fue = -100 mV. Con el valor promedio de la τ (tau) ponderada a cada V_m , estudiado se construyeron los gráficos de los paneles **B-D** de la **Fig.13**. En éstas se puede apreciar que la cinética de cierre de los canales $Ca_v3.1$ prácticamente no sufre modificaciones por la presencia de la amilorida; a diferencia de los canales $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$ cuya cinética de desactivación se aceleró en presencia de amilorida, lo cual se observa como una disminución en el valor de la tau ponderada a todos los V_m explorados. Lo anterior sugiere que la interacción de la amilorida con su sitio de unión en dichos canales favorece la transición del estado abierto al estado cerrado.

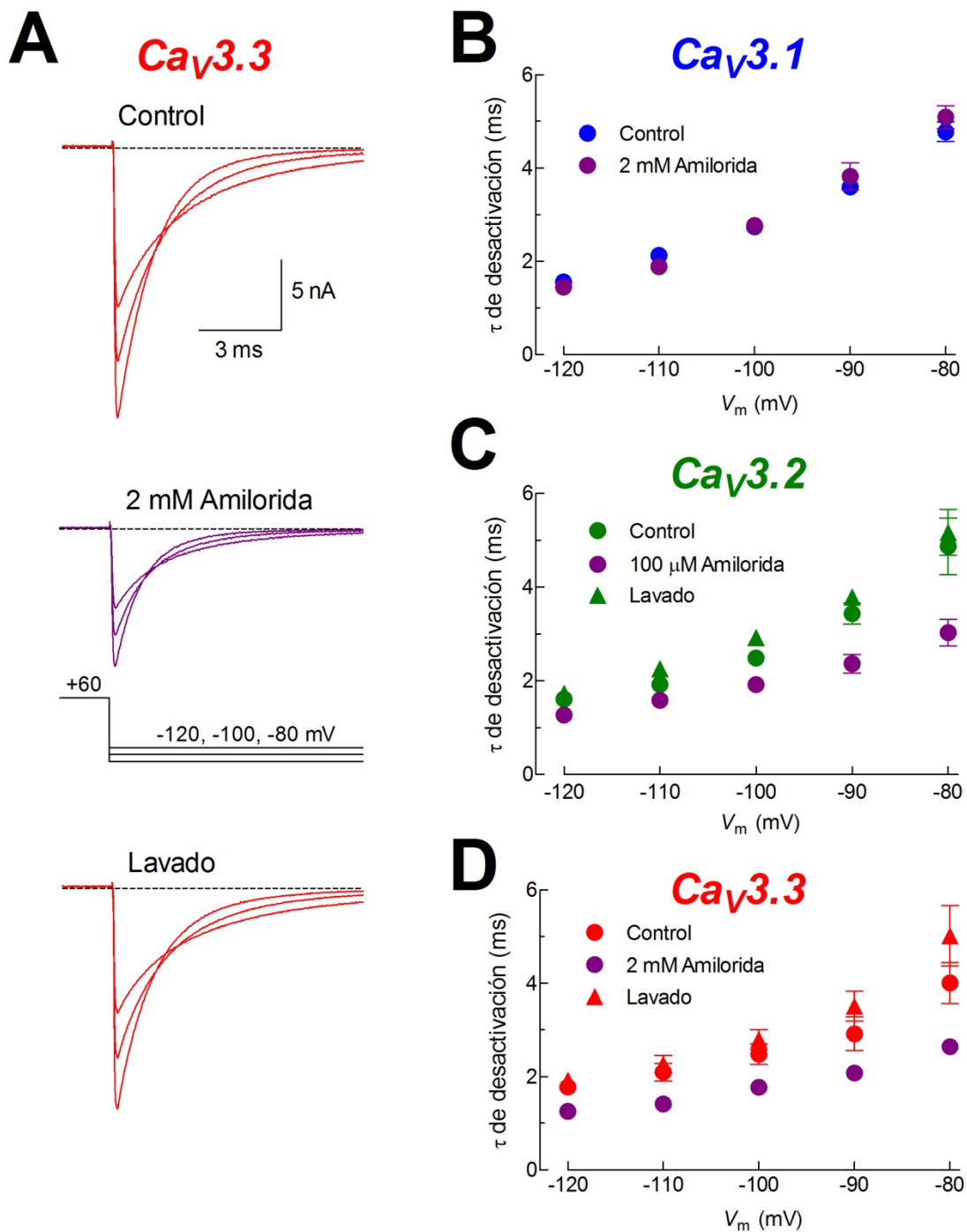


Figura 13. Modificación de la desactivación de los canales Ca_v3 por amilorida. A) Trazos representativos de colas de corriente de los canales Ca_v3 en ausencia (Control), presencia (2 mM Amilorida) y después de retirar el fármaco (Lavado). Para mayor claridad solo se presentan tres colas de corriente a los potenciales indicados en el protocolo de voltaje, y únicamente se muestra una fracción del registro de corriente total. Pevio al pulso despolarizante a +60 mV, el HP fue de -100 mV. El valor promedio \pm SEM de las constantes de tiempo de desactivación de 4 a 6 células se graficó en función del potencial de repolarización para los canales Ca_v3.1 (B), Ca_v3.2 (C) y Ca_v3.3 (D). Note que el cierre de los canales Ca_v3.2 y Ca_v3.3 se aceleró en presencia de la amilorida.

6.2. Mecanismo del bloqueo de la amilorida

Con la finalidad de investigar el mecanismo por el cual la amilorida bloquea los canales Ca_v3 , se exploraron varias propiedades biofísicas del funcionamiento de los canales Ca_v3 con las que se asocian comúnmente bloqueadores de canales iónicos dependientes de voltaje: 1) bloqueo dependiente de voltaje, 2) bloqueo dependiente del estado de inactivación del canal y 3) bloqueo dependiente del uso del canal.

A. Bloqueo dependiente de voltaje

Para determinar si la magnitud del bloqueo de los canales Ca_v3 por amilorida es dependiente del voltaje se utilizaron nuevamente los registros presentados en la **Fig. 11A**. A partir de éstos se calculó el bloqueo promedio de la corriente por amilorida para cada potencial de prueba explorado y el resumen de dichos resultados se muestra en la **Fig. 14**. En este gráfico se puede apreciar que los canales $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$ no presentan un bloqueo dependiente de voltaje, ya que a todos los potenciales de prueba explorados exhiben un porcentaje de bloqueo muy similar. Por el contrario en los canales $Ca_v3.3$ se observa claramente un bloqueo dependiente de voltaje, puesto que el bloqueo es mayor (~70%) a -50 mV y disminuye continuamente conforme el potencial se hace más positivo, hasta llegar únicamente a ~30% de bloqueo a +20 mV).

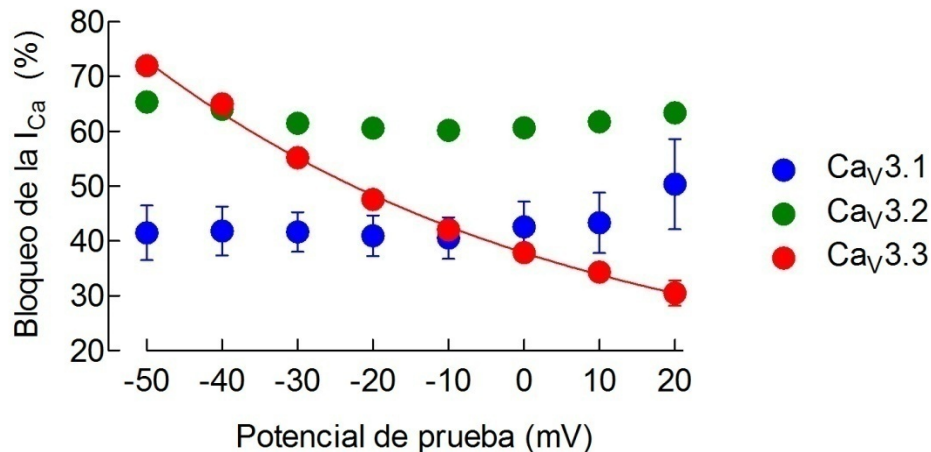


Figura 14. Porcentaje de bloqueo de la I_{Ca} en función del voltaje. Se gráfica el porcentaje de bloqueo de la I_{Ca} en función del valor de V_m para cada uno de los canales Ca_v3 . El número de células estudiadas en cada caso varió entre 11 y 19 células. Los valores se presentan como el promedio \pm SEM. Note que $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$ no presentan un bloqueo dependiente de voltaje, mientras que el bloqueo de los canales $Ca_v3.3$ muestra una clara tendencia de mayor bloqueo a voltajes negativos. La línea roja continua es el ajuste de los datos experimentales con una función exponencial para mostrar el comportamiento del bloqueo.

Los estudios sobre el bloqueo dependiente del estado de inactivación del canal se llevaron a cabo con la finalidad de explorar si la amilorida se une con mayor afinidad a la proteína del canal, cuando éste se encuentra en el estado inactivado. Para ello, se determinó el porcentaje de bloqueo de la corriente de Ca^{2+} a -30 mV producido por la amilorida en cada uno de los tres canales Ca_v3 utilizando cuatro diferentes potenciales de mantenimiento (HPs): -100 , -90 , -80 y -70 . La finalidad de usar estos potenciales es aumentar la proporción de canales que se encuentran en el estado inactivado, es decir, conforme el HP es más positivo, una proporción mayor de canales se encontrarán en el estado inactivado con respecto a un HP más negativo. Los resultados de estos experimentos se condensan en la **Fig. 15**, donde se observa el porcentaje de bloqueo de la I_{Ca} a -30 mV en función del potencial de mantenimiento utilizado para los canales Ca_v3 . Los canales $\text{Ca}_v3.1$ se caracterizaron por un bloqueo dependiente del estado de inactivación, el cual se manifestó por un incremento en el porcentaje de bloqueo de la I_{Ca} a HPs más positivos (comparar el bloqueo a -70 con el de -100 mV). Por el contrario, los canales $\text{Ca}_v3.3$ fueron menos sensibles al bloqueo por amilorida a potenciales más positivos (comparar los mismos voltajes pero ahora de los círculos rojos). Por su parte, el bloqueo de los canales $\text{Ca}_v3.2$ fue prácticamente el mismo a todos los HPs explorados.

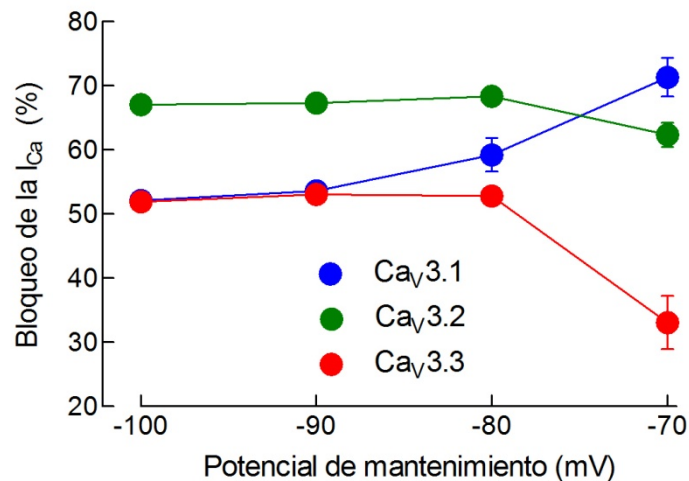


Figura 15. Bloqueo dependiente del potencial de mantenimiento. Las corrientes de $\text{Ca}_v3.1$, $\text{Ca}_v3.2$ y $\text{Ca}_v3.3$ fueron activadas en presencia de 2, 0.1 y 2 mM de amilorida, respectivamente, por pulsos de prueba a -30 mV a partir de cuatro diferentes HPs: -100 , -90 , -80 y -70 mV. Note que $\text{Ca}_v3.1$ manifiesta un bloqueo dependiente de estado que se acentúa con HPs despolarizantes. Por el contrario, los canales $\text{Ca}_v3.3$ muestran menor sensibilidad a la amilorida a HPs más positivos. El bloqueo de los canales $\text{Ca}_v3.2$ fue prácticamente independiente del HP utilizado.

Finalmente, la exploración del bloqueo dependiente del uso del canal fue llevada a cabo por la aplicación de un tren (serie de estímulos) de pulsos despolarizantes a -30 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -100 mV; dichos pulsos fueron aplicados a dos diferentes frecuencias dependiendo del canal; 3 y 4.5 Hz para $Ca_v3.1$; 1.5 y 3 Hz para $Ca_v3.2$; y 1 y 1.5 Hz en el caso de $Ca_v3.3$. En todos los experimentos descritos anteriormente en esta disertación, la frecuencia de estimulación fue de 0.1 Hz; por lo tanto, la razón de incrementar la frecuencia de estimulación es aumentar el uso de los canales Ca_v3 , (es decir, activar a los canales un mayor número de veces en un mismo periodo de tiempo) y determinar si dicha condición favorece o no el bloqueo por la amilorida. En la **Fig. 16A** se ilustran trazos representativos de la I_{Ca} generada por los canales $Ca_v3.1$ en respuesta a la aplicación del protocolo indicado al pie de los mismos. Los números que señalan los trazos de corriente indican el número de pulso dentro del tren de estimulación. Al comparar los trazos en ausencia y en presencia de amilorida, se puede observar que la fracción de corriente remanente al final del tren de estimulación (amplitud del pulso 35 normalizada respecto a la del pulso 1) fue menor en presencia de amilorida que en ausencia de ésta (Control). Para una apreciación más cuantitativa, la amplitud de la I_{Ca} de cada pulso del tren de estimulación (pulsos 2 al 35) fue normalizada respecto a la amplitud del primer pulso, a lo que se denominó *fracción de I_{Ca} remanente* y después promediados entre todas las células estudiadas para cada canal. Los valores promedio se graficaron en función del número de pulso de prueba para cada frecuencia y cada canal en cuestión (**Fig. 16B, C y D**). Se puede observar en los seis paneles de la **Fig. 16** que el aumento en la frecuencia de estimulación produjo una disminución en la fracción de I_{Ca} remanente incluso en ausencia de amilorida, esto se debe a la acumulación de canales inactivados que se genera con cada pulso de prueba, cuyo tiempo de recuperación de la inactivación es más largo que el periodo de tiempo entre cada pulso. De los tres canales tipo T, los $Ca_v3.3$ son los más sensibles a la frecuencia de estimulación, pues con 1.5 Hz la amplitud de corriente del pulso 35 representó solo un 20% de la del pulso 1 (**Fig. 14D**, panel derecho), mientras que el menos sensible a la frecuencia de estimulación fue $Ca_v3.1$ (**Fig. 14B**). Interesantemente, el canal $Ca_v3.3$ exhibió un retardo en el efecto dependiente del uso con la frecuencia de 1 Hz, lo cual se observó como un ligero incremento en la fracción de corriente remanente durante los primeros cinco pulsos del tren de estimulación,

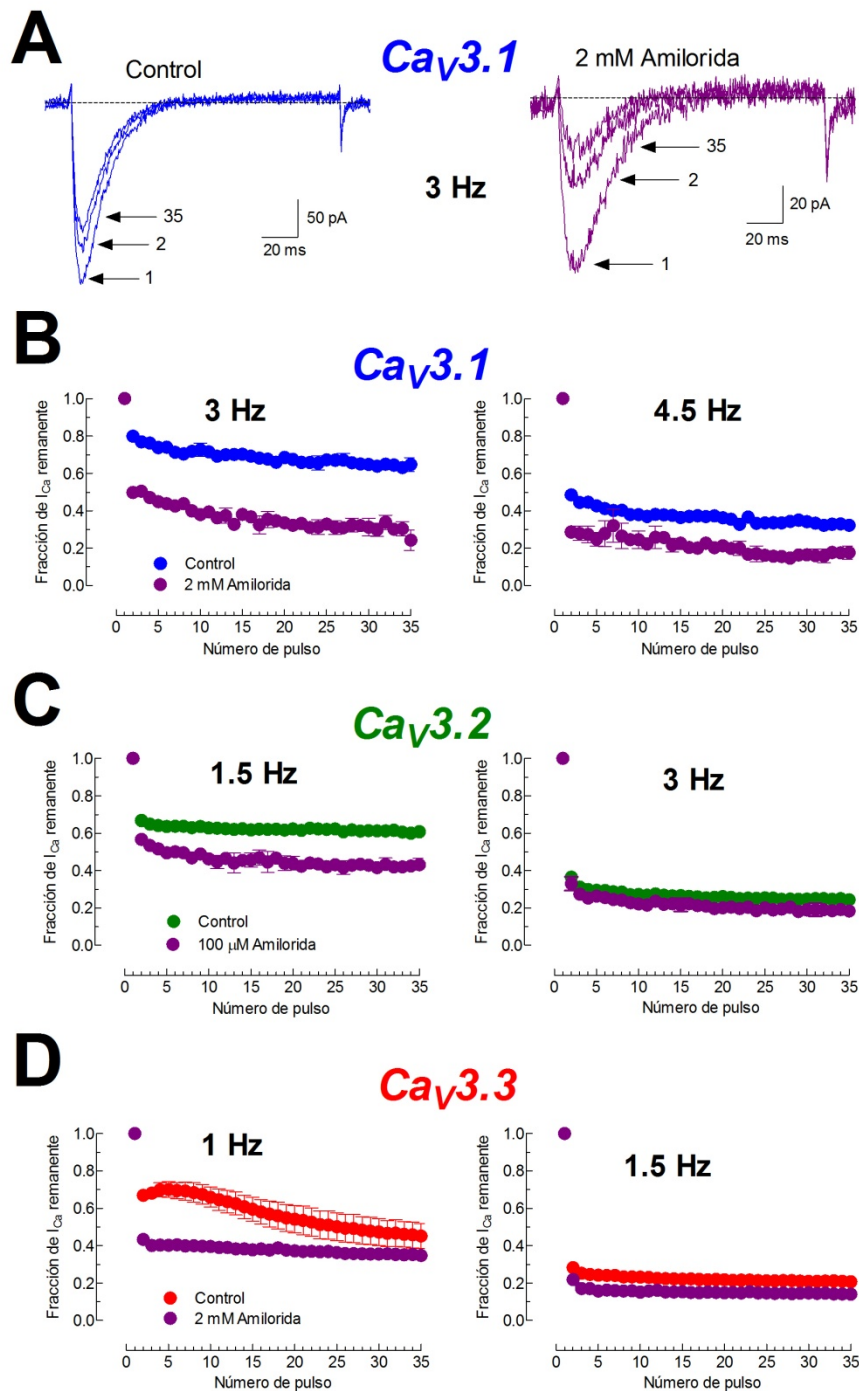


Figura 16. Bloqueo dependiente del uso de los canales Ca_v3 por amilorida. Esta propiedad se estudió mediante la aplicación de trenes de 35 pulsos a -30 mV de 150 ms (Ca_v3.1 y Ca_v3.2) o 500 ms (Ca_v3.3) de duración a las frecuencias de estimulación indicadas, antes y después de la exposición a amilorida. El HP fue siempre de -100 mV. **A)** Trazos representativos de corriente de los canales Ca_v3.1 en ausencia (izquierda) y en presencia (derecha) de 2 mM de amilorida; las flechas indican los pulsos 1, 2 y 35. Note que la fracción de I_{Ca} remanente al final del tren de pulsos de prueba es menor en presencia de amilorida. La amplitud de corriente de cada pulso de prueba fue normalizado con respecto a la del primer pulso, y los valores obtenidos se graficaron en función del no. de pulso para Ca_v3.1 (**B**), Ca_v3.2 (**C**) y Ca_v3.3 (**D**).

posteriormente, dicho valor tiende a disminuir como en el caso de los demás canales (**Fig. 16D**, panel izquierdo). Este fenómeno es muy probablemente debido al efecto de facilitación de la corriente que ha sido descrito previamente por otros grupos de investigación y nosotros mismos (Klockner *et al.*, 1999; Chemin *et al.*, 2002; Gomora *et al.*, 2002).

En cuanto al posible bloqueo dependiente del uso del canal inducido por la amilorida, éste efecto fue muy evidente en los canales $Ca_v3.1$, ya que en la presencia del fármaco, la fracción de I_{Ca} remanente siempre fue menor con respecto a la condición control a las dos frecuencias de estimulación exploradas. No obstante, a la frecuencia de 3 Hz, la amilorida provocó una disminución adicional del 34%, mientras que a 4.5 Hz el porcentaje fue de 15%. El bloqueo dependiente del uso del canal para $Ca_v3.2$ a 1.5 Hz fue más discreto y de hecho a 3 Hz no hubo diferencia entre la condición Control y Amilorida (**Fig. 14C**). En el caso del canal $Ca_v3.3$, el diurético no produjo un aumento sustancial en la fracción de I_{Ca} remanente con respecto a la condición control; no obstante, el efecto que produjo la amilorida fue prevenir la facilitación de la corriente del canal $Ca_v3.3$ observada en la condición control a 1Hz (**Fig. 16D**, panel izquierdo).

B. Efecto de la amilorida sobre la inactivación en el estado estacionario

Con la finalidad de investigar el efecto de la amilorida sobre la inactivación en el estado estacionario de los canales Ca_v3 , se procedió a aplicar el protocolo denominado *Hinf* (ver protocolos de registro en Materiales y Métodos), el cual consiste en dos pulsos de voltaje, el primero es un pulso condicionante de 15 s de duración a diferentes valores de V_m (entre -110 y -45 mV), cuyo fin es conducir a los canales a un nivel estacionario de inactivación; el segundo, es un pulso de prueba a -30 mV. La amplitud relativa de la corriente registrada en respuesta a este último pulso corresponde a la fracción de canales que no se inactivaron durante el pulso condicionante. En la **Fig. 17A** se observan los trazos de corriente generados por los canales $Ca_v3.2$ en respuesta a la aplicación del protocolo *Hinf*, donde se puede apreciar que después de permanecer a -75 mV durante 15 s, cerca del 50% de los canales se encuentran en el estado inactivado, ya que la amplitud de la I_{Ca}

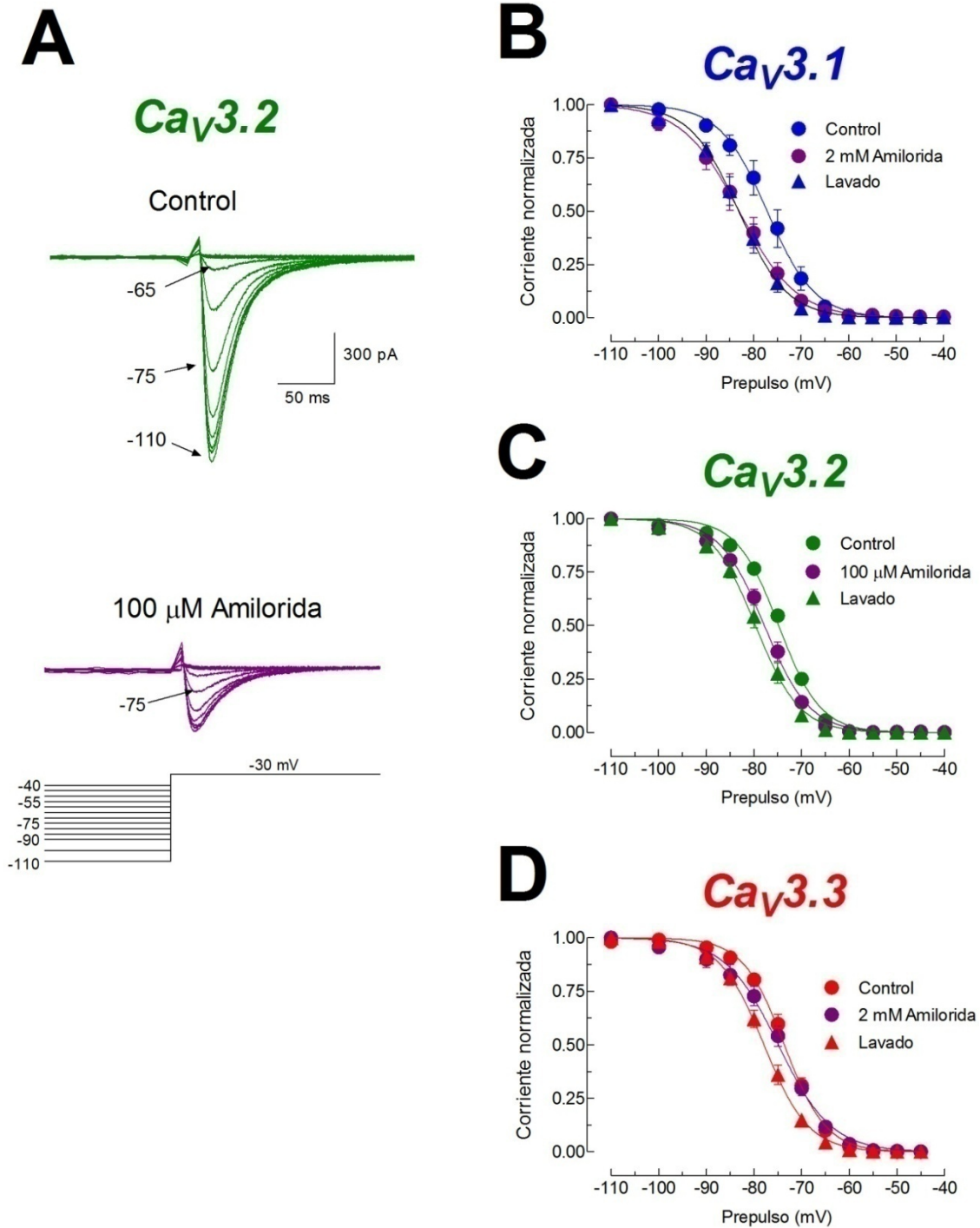


Figura 17. Inactivación en el estado estacionario de los canales Ca_v3. **A)** Trazos representativos de la I_{Ca} del canal Ca_v3.2 evocada a -30 mV después de la aplicación de pulsos condicionantes de 15 s de duración a diferentes valores de V_m comprendidos entre -110 y -45 mV. Las curvas de inactivación dependiente de voltaje en el estado estacionario para los canales Ca_v3.1, Ca_v3.2 y Ca_v3.3 se muestran en **B**, **C** y **D**, respectivamente. Los gráficos muestran en el eje de las ordenadas la fracción de canales disponibles para ser activados a -30 mV en función del voltaje del pulso condicionante. Los datos se muestran como el promedio \pm SEM de 6 a 8 células. Las líneas continuas son el ajuste de los datos con la ecuación de Boltzmann.

registrada con el pulso de prueba a -30 mV fue aproximadamente la mitad de la que se registró cuando el pulso condicionante fue de -110 mV. La dependencia al voltaje es una marca de identidad de los canales Ca_v3 , y una evidencia de ello se observa en el registro obtenido después de un pulso condicionante a -65 mV, voltaje al cual la fracción de canales disponibles para ser activados se redujo a menos del 10%, es decir un cambio de 10 mV en el valor del pulso condicionante provocó la inactivación del 40% de los canales. La amplitud de corriente generada por el pulso de prueba a -30 mV después de cada pulso condicionante, fue normalizada con respecto a la amplitud de corriente máxima observada (I_{max}), la cual se obtiene cuando el pulso condicionante tiene un valor de -110 mV. Posteriormente, con el valor promedio de la fracción de canales disponibles para ser activados se construyeron los gráficos en función del voltaje del pulso condicionante para cada uno de los canales Ca_v3 , estos resultados se resumen en la **Fig. 17B, C y D**. Los puntos experimentales fueron ajustados con la ecuación de Boltzmann y los parámetros obtenidos de dicho ajuste son mostrados en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Parámetros de la inactivación en el estado estacionario de los canales Ca_v3 .

	$Ca_v3.1$		$Ca_v3.2$		$Ca_v3.3$	
	$V_{1/2}$	k	$V_{1/2}$	k	$V_{1/2}$	k
Control	-77.0 ± 1.6	4.5 ± 0.2	-74.8 ± 0.5	4.3 ± 0.1	-73.6 ± 0.8	4.2 ± 0.1
Amilorida	$-83.0 \pm 1.9^*$	$5.6 \pm 0.1^*$	$-77.9 \pm 0.8^*$	$4.6 \pm 0.1^*$	-73.9 ± 0.6	$4.9 \pm 0.1^*$
Lavado	-82.7 ± 1.5	4.7 ± 0.1	-79.6 ± 0.9	4.4 ± 0.1	-77.9 ± 0.8	4.5 ± 0.1

Los valores se muestran como el promedio \pm SEM obtenidos en la condición control, en presencia de amilorida y después del lavado. Las diferencias significativas se muestran con (*), $P < 0.05$.

C. La amilorida no interacciona con el estado cerrado de los canales $Ca_v3.3$

Para investigar si el bloqueo de la amilorida involucra su unión al estado cerrado del canal, se utilizó un protocolo de voltaje descrito inicialmente por el grupo del Dr. Stephen W. Jones (Obejero-Paz *et al.*, 2004), el cual denominamos aquí como *BCS* (ver Materiales y Métodos) y que se ilustra en la **Fig. 18**. En ésta se ilustran registros representativos de corrientes generadas por canales $Ca_v3.3$ obtenidos en presencia del ion inorgánico Y^{3+} ,

que bloquea el estado cerrado de los canales Ca_v3 (Obejero-Paz *et al.*, 2004), como ejemplo de dicho efecto (**Fig. 18**, *trazos superiores*), así como registros del mismo canal en presencia de 2 mM de amilorida (*trazos inferiores*).

La región importante de los trazos de corriente obtenidos en respuesta a la aplicación del protocolo, son las corrientes salientes que se muestran debajo de la línea punteada, las cuales, bajo las presentes condiciones de registro, son debidas al transporte del ión Cs^+ hacia el exterior de la célula, dichas corrientes disminuyen en amplitud cuando el agente bloqueador interacciona con el estado cerrado del canal. Este fenómeno se observa claramente cuando se utilizó Y^{3+} , sin embargo, la presencia de amilorida no produjo el mismo efecto, lo que sugiere que el mecanismo de bloqueo de este diurético no involucra su interacción con el estado cerrado del canal.

D. Acoplamiento molecular de la amilorida con los canales Ca_v3

Con la finalidad de encontrar posibles sitios de interacción entre la amilorida y los canales Ca_v3 que permitan explicar los efectos de este fármaco en las propiedades electrofisiológicas que se han descrito en esta disertación, se procedió a realizar modelos por homología en tres dimensiones del dominio de poro de los canales Ca_v3 (a la fecha no existen estructuras cristalográficas reportadas de estos canales), para posteriormente enfrentarlos con la estructura tridimensional de la amilorida. Lo anterior se realizó con el acoplamiento molecular o *docking*, un procedimiento bioinformático que intenta predecir la unión no covalente de macromoléculas (receptor) y pequeñas moléculas (ligando). Partiendo de estructuras disponibles en la base de datos de proteínas (PDB, *Protein Data Base*), de estructuras obtenidas computacionalmente por simulaciones de dinámica molecular o por modelaje basados en criterios de homología. El objetivo del *docking* es predecir la unión de un ligando en diferentes conformaciones y el grado de afinidad con un receptor. El resumen de los resultados obtenidos con dicha metodología se presenta en la **Fig. 19**. En primer lugar se modeló el canal de potasio KcsA (Doyle *et al.*, 1998) y se realizó el acoplamiento molecular con el tetraetilamonio (TEA), su agente bloqueador por excelencia, encontrando que el TEA se une directamente al poro del canal, tal y como se ha descrito experimentalmente (Lenaeus *et al.*, 2005).

Ca_v3.3

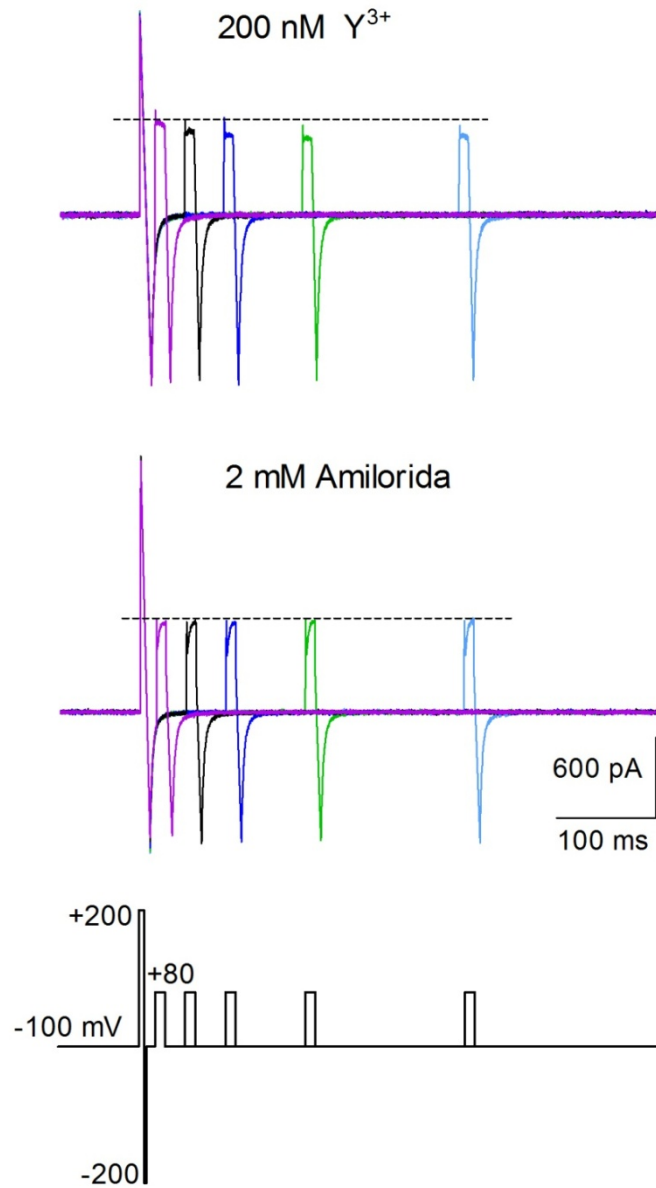


Figura 18. La amilorida no interacciona con el estado cerrado de los canales Ca_v3.3. El estado cerrado del canal fue promovido por la aplicación del protocolo mostrado en la parte inferior de la figura. Como un ejemplo de interacción con el estado cerrado, se muestra el efecto de 200 nM del ión trivalente itrio (Y³⁺; registros superiores). Obsérvese como la interacción con el estado cerrado del canal se refleja en la disminución de la corriente saliente de los canales Ca_v3.3, conforme se prolonga el período de tiempo entre el pulso a +200 mV (que desbloquea a todos los canales bloqueados por Y³⁺), y el pulso de prueba a +80 mV (el cual determina la proporción de canales bloqueados durante el tiempo que estuvieron cerrados a -100 mV). Las líneas negras discontinuas indican el nivel de corriente del primer pulso de prueba a +80 mV. Por el contrario, en presencia de 2 mM de amilorida la amplitud de la corriente saliente permanece constante durante los periodos de tiempo estudiados, sugeriendo de una ausencia de bloqueo del diurético en el estado cerrado del canal Ca_v3.3.

Con tal resultado, la metodología de acoplamiento molecular empleada fue validada, además, la interacción entre el TEA y el KcsA funcionó como un control positivo de interacción (**Fig. 19A**). Posteriormente, con los modelos del dominio de poro de los canales Ca_v3 , se procedió a realizar el ensayo de acoplamiento molecular para cada canal, el cual indicó dos sitios de interacción energéticamente estables en una región cercana al poro del canal de $Ca_v3.1$. En el caso de $Ca_v3.2$, se encontraron de igual forma dos sitios de interacción, uno ubicado relativamente cerca del poro del canal y el otro en una región de la cara intracelular del canal, sin embargo sólo el primero fue energéticamente estable. Finalmente, para $Ca_v3.3$ se identificaron tres sitios de interacción, dos con cercanía al poro del canal y uno en la cara intracelular del canal, todos fueron energéticamente estables (**Fig. 19A**).

Por otra parte, con la finalidad de obtener un resultado cuantitativo de las interacciones (sitios de unión de la amilorida con la proteínas del canal) propuestas por los modelos de acoplamiento molecular de la **Fig. 19A**, se calculó el valor promedio de la energía mínima de unión (en kcal/mol) y la distancia promedio entre el ligando y la proteína del canal (en Angstroms, Å) para cada combinación canal/ligando. Estos valores se presentan en forma de gráfico en la **Fig. 19B**. Ciertamente ambos parámetros fueron muy buenos para la interacción del canal KcsA y el TEA (control positivo), es decir, la combinación de una energía de unión de -3.5 kcal/mol y una distancia de solo 3 Å es indicativo de un acoplamiento de alta afinidad. Por el contrario, la interacción entre el mismo canal y la amilorida resultó en un valor muy similar de energía de unión, pero la distancia promedio se incremento más de 6 veces (18.9 Å), lo cual resulta en una interacción poco probable (control negativo). Respecto a los canales Ca_v3 con la amilorida, el mejor cociente energía/distancia se observó en los canales $Ca_v3.2$, lo que sugiere que dicho canal presenta mayor afinidad global hacia la amilorida que los otros dos canales Ca_v3 . Los cocientes respectivos para $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.3$ son muy parecidos entre sí, lo cual está de acuerdo con los valores de IC_{50} de la amilorida para ambos canales (**Fig. 10**).

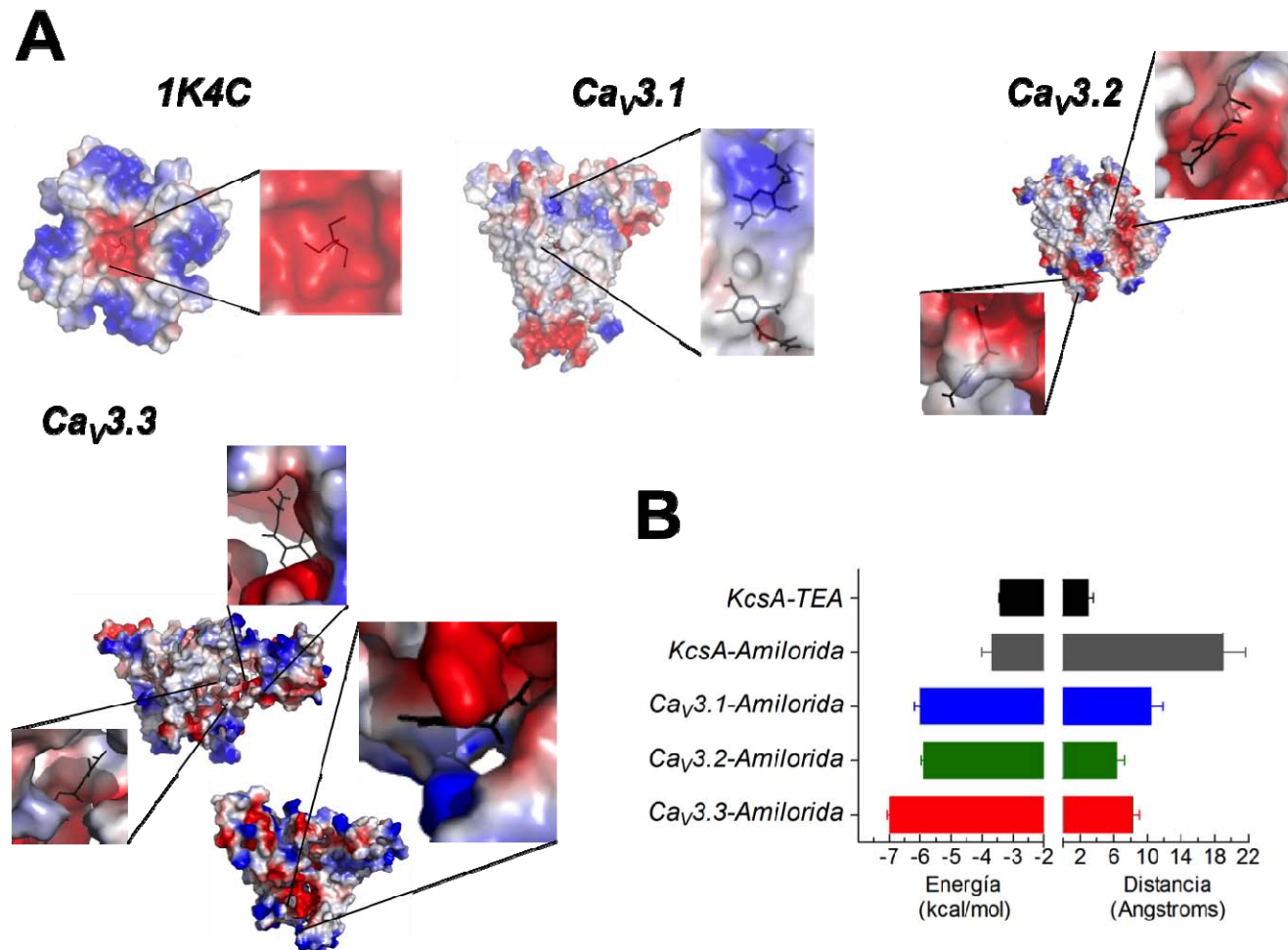


Figura 19. Acoplamiento molecular de la amilorida y los canales Ca_v3. **A)** Representación de superficie del acoplamiento del canal de potasio 1K4C con tetraetilamonio (TEA) y de los modelos del dominio del poro de los canales Ca_v3 con la amilorida. Los sitios de interacción de los ligandos (TEA y amilorida) con los receptores (1K4C y modelos de los canales Ca_v3) se muestran como recuadros amplificados de la representación de superficie. La interacción menos estable entre la amilorida y el modelo del canal Ca_v3.2 se muestra en el recuadro amplificado inferior. **B)** El gráfico representa el valor promedio de la energía mínima de unión (barras de la izquierda) y la distancia promedio de interacción entre el ligando y la proteína del canal (barras a la derecha) para cada combinación ligando/canal. Los resultados obtenidos del acoplamiento entre el canal de potasio 1K4C y TEA fueron usados como un control positivo de interacción (barras negras). El acoplamiento entre la amilorida y el canal 1K4C fue empleado como un control negativo de interacción (barras grises). Los valores se expresan como el promedio ± SEM.

E. Efecto de la amilorida en la recuperación de la inactivación de los canales Ca_v3

Con base en los resultados obtenidos del acoplamiento molecular entre la amilorida y los canales Ca_v3 , los cuales sugieren posibles sitios de interacción en la cara intracelular de los canales, se procedió a evaluar la recuperación de la inactivación de cada uno de los canales Ca_v3 y su posible modificación por la acción de la amilorida. Previamente se han reportado evidencias experimentales que involucran regiones intracelulares de los canales con el proceso de inactivación (Staes *et al.*, 2001; Arias *et al.*, 2008; Baumgart *et al.*, 2008). Por lo tanto, la hipótesis de trabajo fue que si la amilorida interaccionaba en cierta medida con alguna región intracelular del canal, la recuperación de la inactivación podría ser modificada. Para poner a prueba esta hipótesis se aplicó el protocolo denominado *Recover-100* para $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$ y *Recover-100i* para $Ca_v3.3$ (ver Métodos). Los resultados de estos experimentos se ilustran en la **Fig. 20**. En primer lugar se presentan trazos representativos de la recuperación de la inactivación para el canal $Ca_v3.3$ en ausencia y en presencia de amilorida (**Fig. 20A**). Las corrientes de Ca^{2+} fueron inactivadas por un pulso despolarizante a -30 mV, después del cual el V_m se repolarizó a -100 mV durante periodos de tiempo desde 1 hasta 1200 ms; finalmente, se aplicó un pulso de prueba a -30 mV para evocar la I_{Ca} generada por los canales que se recuperaron de la inactivación durante el tiempo a -100 mV. La corriente máxima durante la despolarización a -30 mV del segundo pulso fue normalizada con respecto a la del primero en la condición control, en presencia de amilorida y después del lavado, y los valores promedio se graficaron en función del tiempo a -100 mV para los tres canales Ca_v3 (**Fig. 20B, C y D**). Interesantemente, sólo $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.3$ exhibieron un retraso significativo en el curso temporal de la recuperación de la inactivación (**Tabla 4**), lo cual sugiere que la amilorida estabiliza el estado inactivado de dichos canales, resultando en una transición más lenta del estado inactivado al estado cerrado. Este fenómeno es completamente reversible, ya que al retirar la amilorida de la cámara de registro (Lavado), la recuperación de la inactivación vuelve a su condición control. Por su parte, los canales $Ca_v3.2$ no sufrieron cambios sustanciales en esta propiedad biofísica debida a la presencia de amilorida. Lo anterior es consistente con los resultados obtenidos con el *docking* molecular de la **Fig. 19**, que sugieren un sitio de interacción energéticamente inestable en la cara intracelular

del canal $Ca_v3.2$, lo cual explicaría en parte la falta de efecto de la amilorida sobre la recuperación de la inactivación de este canal.

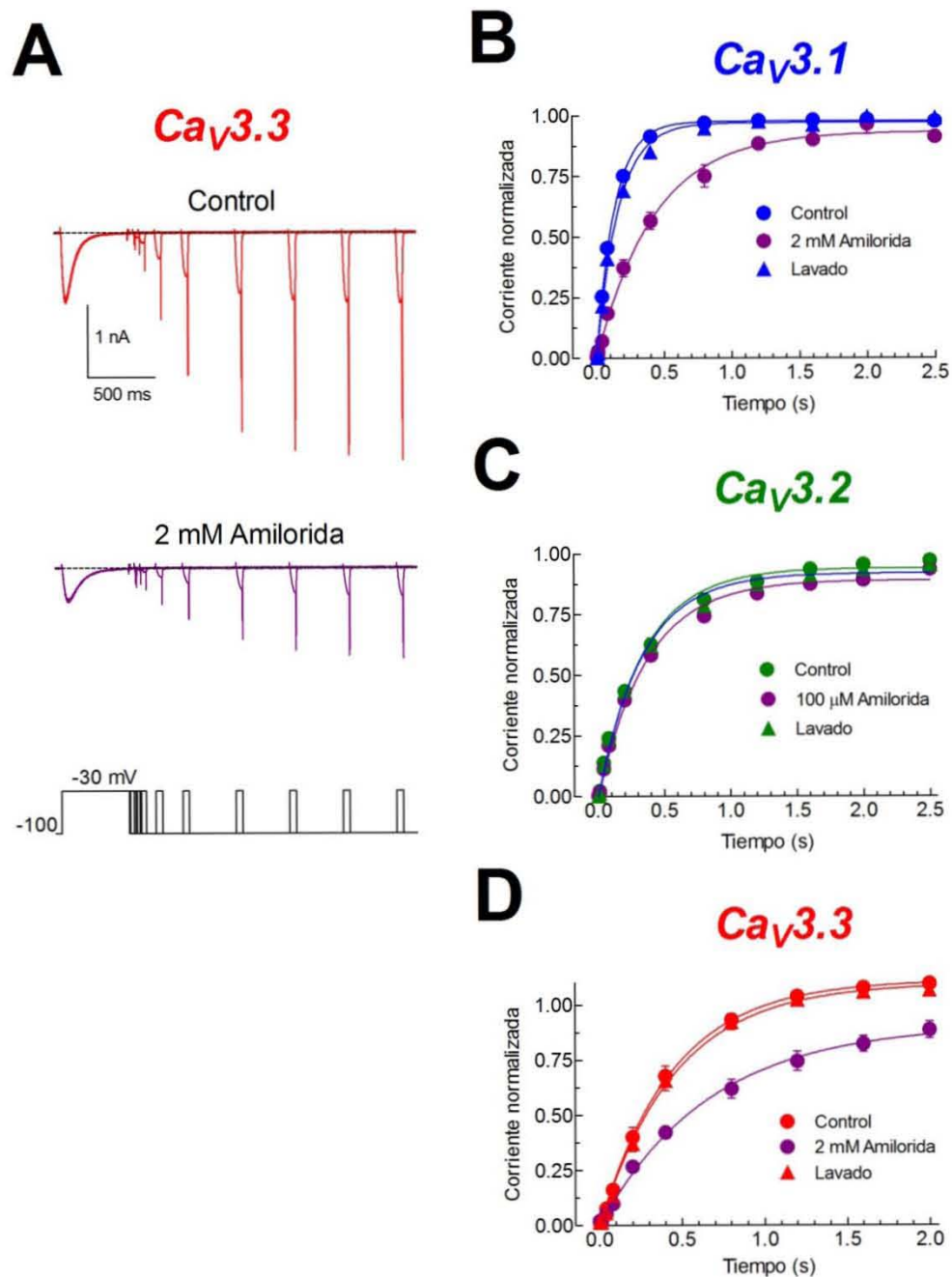


Figura 20. Recuperación de la inactivación de los canales Ca_v3 en presencia de amilorida. **A)** Trazos representativos de la recuperación de la inactivación del canal $Ca_v3.3$ antes y durante la exposición a 2 mM amilorida. Las colas de corriente que se generan al repolarizar la membrana a -100 mV de los dos últimos pulsos fueron truncadas digitalmente para apreciar mejor la corriente durante los pulsos a -30 mV. La corriente normalizada (promedio \pm SEM; $n = 4 - 6$) se graficó en función del tiempo a -100 mV para los canales $Ca_v3.1$ (**B**), $Ca_v3.2$ (**C**) y $Ca_v3.3$ (**D**). Las líneas continuas son el ajuste de los datos con funciones exponenciales, cuyas constantes de tiempo se presentan en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Constantes de tiempo de recuperación de la inactivación (τ_h) de los canales Ca_v3 en presencia y ausencia de amilorida.

	Control	Amilorida	Lavado
$Ca_v3.1$	135 ± 7	428 ± 46*	162 ± 10
$Ca_v3.2$	344 ± 24	370 ± 31	337 ± 29
$Ca_v3.3$	441 ± 41	661 ± 91*	459 ± 43

Los valores se presentan como el promedio ± SEM obtenidos en las condiciones Control, Amilorida y Lavado. Mismas células que la **Fig. 20**. Las diferencias significativas se indican con (*), $P < 0.05$.

F. Efecto de la amilorida intracelular en la actividad de los canales Ca_v3

La última serie de experimentos del presente trabajo de tesis consistió en explorar el bloqueo que ejerce la amilorida sobre los canales $Ca_v3.3$ desde la parte intracelular del canal, para ello se suplementó la solución interna de registro (ver Materiales y Métodos) con amilorida a dos concentraciones, 0.2 y 2 mM. En concordancia con los resultados del *docking* molecular, la presencia de amilorida en el ambiente intracelular bloqueó de manera robusta las corrientes generadas por los canales $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.3$; por el contrario, $Ca_v3.2$ presentó un bloqueo discreto en la presente condición. Cabe señalar que en estos experimentos el registro de la corriente a -30 mV se inicio inmediatamente después de romper el Giga-sello formado entre la membrana celular y la punta de la micropipeta, esto se hizo para monitorear lo más adecuadamente posible el efecto de la amilorida sobre la corriente inicial de la célula en cuestión. De esta manera se registró una I_{Ca} inicial que disminuye en función del tiempo de exposición a amilorida hasta el establecimiento de un bloqueo estacionario. El resumen de los resultados se presenta en la **Tabla 5** y la **Fig. 21**.

Como se puede apreciar en la **Tabla 5**, el bloqueo por amilorida del canal $Ca_v3.2$ fue mucho menor comparado con el resto de los miembros de la familia Ca_v3 (**Fig. 21**), lo cual sugiere que la región intracelular del canal $Ca_v3.2$ presenta un sitio unión de baja afinidad hacia la amilorida y que el bloqueo de dicho canal se lleva a cabo de manera preferencial desde la cara extracelular, ya que, cuando se usa amilorida en la solución externa de registro, $Ca_v3.2$ es quien presenta la mayor sensibilidad hacia el fármaco (**Fig. 21**). Por el contrario, $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.3$ son bloqueados por amilorida desde la cara externa e interna

del canal aproximadamente con la misma potencia, sugiriendo sitios de interacción en la cara externa e interna de estas proteínas.

Tabla 5. Bloqueo intracelular de los canales Ca_v3 por amilorida.

Bloqueo de la I_{Ca} (%)			
	$Ca_v3.1$	$Ca_v3.2$	$Ca_v3.3$
0.2 mM Amilorida	14.9 ± 3.1	10.6 ± 6.7	23.8 ± 3.9
2 mM Amilorida	76.1 ± 3.5	36.3 ± 4.5	52.5 ± 4.7

Los valores se muestran como el porcentaje de bloqueo promedio ± SEM obtenido para cada concentración de amilorida. $n = 3 - 9$ células en cada condición experimental.

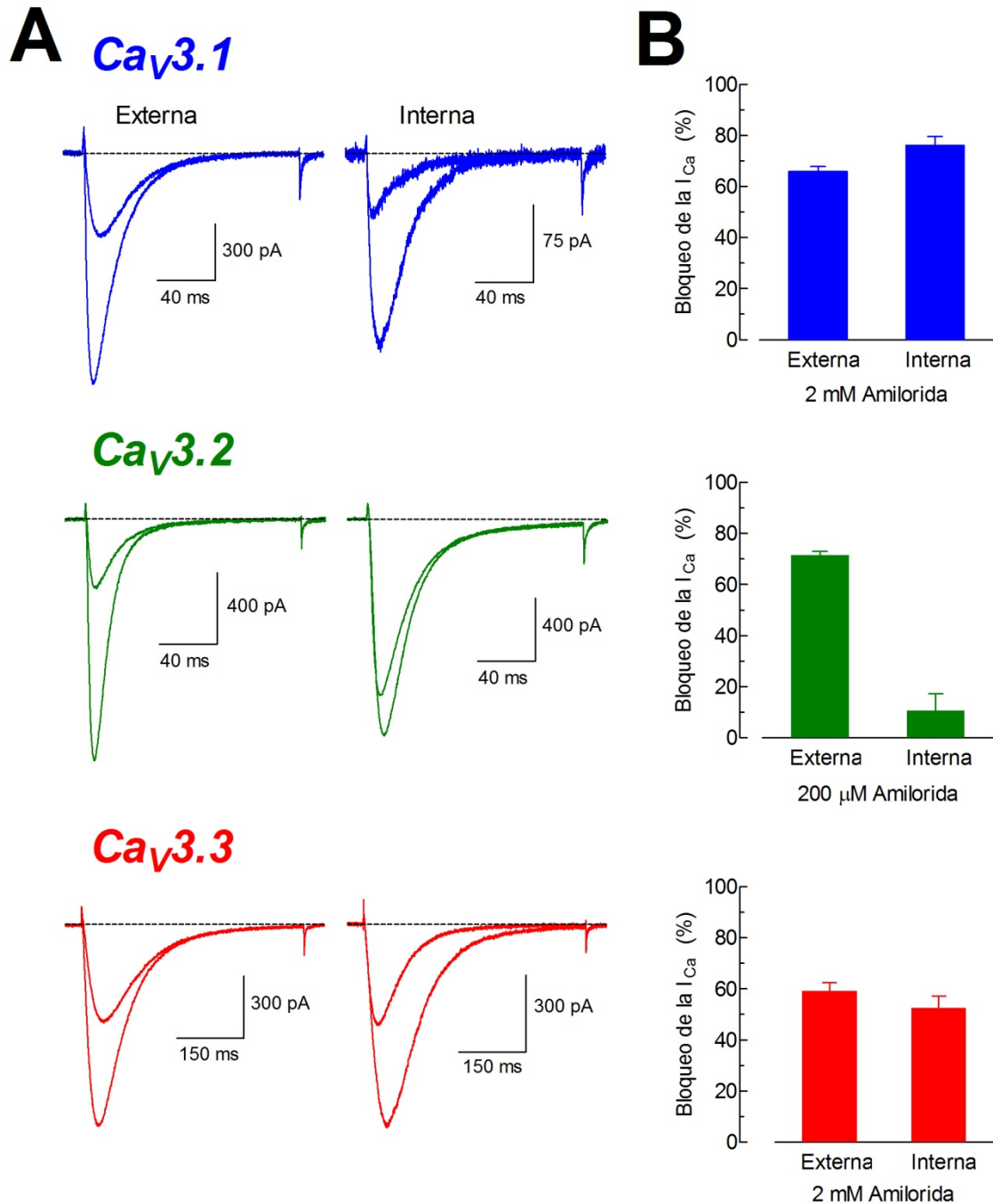


Figura 21. Bloqueo extra e intracelular de los canales Ca_v3 por amilorida. **A)** Trazos representativos de I_{Ca} que ilustran el bloqueo de los canales Ca_v3 cuando la amilorida es agregada en la solución de registro externa (izquierda) o interna (derecha). Las corrientes de Ca^{2+} se obtuvieron en respuesta a pulsos despolarizantes a -30 mV a partir de un HP de -100 mV. **B)** Porcentaje de bloqueo de la I_{Ca} de los canales Ca_v3 por amilorida externa o interna. Las barras muestran el promedio \pm SEM de 4 a 9 células por condición. Note que la amilorida bloquea preferentemente el canal $Ca_v3.2$, pero solo cuando se aplica desde la parte extracelular del canal.

VII. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis demuestran que la amilorida bloquea de manera diferencial a los miembros de la familia Ca_v3 clonados de humano, de los cuales $Ca_v3.2$ es aproximadamente diez veces más sensible que $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.3$. El bloqueo ejercido por la amilorida presenta un comportamiento concentración-respuesta característico, con coeficientes de Hill que sugieren más de un sitio de interacción del fármaco con los canales. El mecanismo de bloqueo de la amilorida sobre los canales Ca_v3 parece involucrar su interacción con el estado abierto e inactivado del canal, pero no con el estado cerrado. Interesantemente, el efecto de la amilorida sobre los canales $Ca_v3.3$ se diferenció de los otros dos por presentar un bloqueo dependiente de voltaje. Finalmente, el empleo de herramientas computacionales permitieron obtener información acerca del acoplamiento molecular entre la amilorida y los modelos tridimensionales del dominio del poro de los canales Ca_v3 , lo cual permitió determinar que la mayor sensibilidad de los canales $Ca_v3.2$ a la amilorida, se debe principalmente a un sitio de unión en la cara extracelular del canal, mientras que otro sitio localizado en la parte intracelular del canal presenta una afinidad ~ 7 veces menor. A continuación se discute la relevancia e implicaciones de estos resultados.

7.1. Bloqueo de canales Ca_v3 por amilorida

El bloqueo por amilorida de los canales recombinantes $Ca_v3.1$ provenientes de ratón ya ha sido descrito anteriormente (Lacinova *et al.*, 2000), sin embargo en dicho estudio 5 mM de amilorida bloqueó menos del 50% de la corriente de calcio. Dicha discrepancia con los resultados presentados en esta disertación podrían ser debidos a diferencias en la secuencia entre las proteínas de ratón y de humano, así como a las diferentes concentraciones del acarreador de carga utilizado en ambos trabajos. Interesantemente, la clona de $Ca_v3.1$ utilizada en este trabajo carece de 18 aminoácidos en el asa que une los dominios III y IV de la subunidad α de estos canales, que si presenta la clona de ratón (Klugbauer *et al.*, 1999; Cribbs *et al.*, 2000). Asimismo, Lacinova y cols. (2000) utilizaron 20 mM de Ca^{2+} en sus experimentos con amilorida, mientras que en el presente trabajo se utilizó sólo 5 mM de Ca^{2+} como transportador de carga. Se ha descrito en varios trabajos

que el bloqueo de los canales Ca_v3 , y en general de los canales Ca_v , disminuye frecuentemente a concentraciones altas del acarreador de carga (Nelson, 1986; Herrington & Lingle, 1992; Lee *et al.*, 1999b; Martin *et al.*, 2000; Heady *et al.*, 2001).

Por otra parte, un trabajo previo encontró una IC_{50} de 167 μM de amilorida para los canales $Ca_v3.2$ de humano (Williams *et al.*, 1999), dato que se encuentra en el mismo orden de concentración encontrado en el presente trabajo de tesis (**Fig. 10**). No obstante, la diferencia en los valores de IC_{50} entre los dos trabajos puede ser debida nuevamente al acarreador de carga utilizado (en el trabajo mencionado utilizan 15 mM de Ba^{2+}).

En cuanto a los canales $Ca_v3.3$, a la fecha no existe información sobre su sensibilidad a la amilorida, por lo que las observaciones obtenidas en la presente disertación son originales y novedosas. Los resultados demuestran que el canal $Ca_v3.3$ clonado de humano es más parecido al canal $Ca_v3.1$ que al canal $Ca_v3.2$ en cuanto a la sensibilidad a la amilorida, y que es el único de los tres canales Ca_v3 en el que el efecto de la amilorida se manifiesta como bloqueo dependiente de voltaje (**Fig. 11, 14 y Tabla 2**). Lo anterior podría deberse a que los sitios de unión de la amilorida en el canal $Ca_v3.3$ se ubican dentro del campo eléctrico de la membrana (**Fig. 19**).

El bloqueo por amilorida de las corrientes de calcio generadas por los canales nativos Ca_v3 (llamados también tipo T) ha sido descrito desde el trabajo de Tang y col. (1988), en el que se observó un bloqueo preferencial de las corrientes tipo T en neuronas del ganglio de la raíz dorsal de pollo, así como también en células de Purkinje del corazón de perro (Hirano *et al.*, 1989), y en miocitos ventriculares de cuyo (Tytgat *et al.*, 1988). En estos trabajos se encontraron IC_{50} s para la amilorida en un intervalo de 30 a 233 μM , lo cual es consistente con los resultados del presente trabajo de tesis, ya que los canales $Ca_v3.2$ son los más abundantes en estos tejidos (Talley *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 1999; Mizuta *et al.*, 2010). Aunado a ello, la baja sensibilidad a amilorida de las corrientes tipo T de células neuroendocrinas tumorales (GH3), puede ser explicado por la expresión preferencial de canales $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.3$ en dichas células (Mudado *et al.*, 2004). Para confirmar en corrientes tipo T nativas el alto valor de IC_{50} encontrado en este trabajo para el bloqueo de

los canales $Ca_v3.3$ por amilorida, se deberá explorar preparaciones enriquecidas en este tipo de canal Ca_v3 , como lo son las neuronas del núcleo reticular del tálamo y de la habénula lateral (Coulter *et al.*, 1989; Huguenard & Prince, 1992; Huguenard *et al.*, 1993).

7.2. Mecanismo de bloqueo de la amilorida en los canales Ca_v3

Los ajustes de la curva Concentración-Respuesta para cada canal Ca_v3 proporcionaron un coeficiente de Hill (h) por debajo de la unidad (**Fig. 10**), sugiriendo la existencia de múltiples sitios de unión del ligando, en este caso la amilorida, con su receptor, los canales Ca_v3 (Abeliovich, 2005; Prinz, 2009). Esta interpretación es apoyada por la información obtenida del *docking* de la amilorida con los modelos tridimensionales de los canales Ca_v3 , la cual sugiere al menos dos sitios de unión energéticamente muy estables para cada canal (**Fig. 19**). Por lo tanto, es posible inferir que el efecto global de la amilorida sobre los canales Ca_v3 corresponde a la suma de efectos individuales ocasionados por cada sitio de interacción con la amilorida.

El análisis de la relación $I-V$ proporciona información valiosa acerca del mecanismo de bloqueo de un agente sobre un canal iónico. Así, las curvas $I-V$ de los canales Ca_v3 en ausencia y presencia de amilorida indican que la presencia del diurético causó un desplazamiento de 7 mV hacia voltajes más positivos exclusivamente en la relación $I-V$ de los canales $Ca_v3.3$ (**Fig. 11B**), es decir, el bloqueo de estos canales por amilorida fue dependiente de voltaje. Esta observación sugiere una posible interacción del fármaco con la región del sensor de voltaje (segmentos S4) de dichos canales, como se ha reportado para algunas toxinas (Lee *et al.*, 2003; Phillips *et al.*, 2005; Edgerton *et al.*, 2010), aunque también puede ser debido a que el sitio de unión de la amilorida en el canal $Ca_v3.3$ se encuentra dentro del campo eléctrico de la membrana, tal y como se ha observado con cationes monovalentes y divalentes (Woodhull, 1973; Eaton & Brodwick, 1980; Wu & Lipsius, 1990); e incluso con la misma amilorida en canales de sodio epiteliales (Palmer, 1984). Nuestra observación adicional de que el bloqueo de la I_{Ca} de los canales Ca_v3 por amilorida disminuye a potenciales positivos (**Fig. 14**), a tal grado que las corrientes salientes son afectadas pobremente (**Fig. 11B**), es congruente con la posibilidad de que la amilorida se une en alguna región del poro del canal, obstruyendo el flujo de iones a

través de éste, hecho que desaparece a potenciales positivos, donde la fuerza impulsora para la salida de los iones (Cs^+ en este caso) es lo suficientemente grande para “despegar” la amilorida de su sitio de unión. No obstante, nuestros resultados no permiten descartar la posibilidad de un segundo sitio de unión de la amilorida que afecte (directa o indirectamente) el funcionamiento del sensor de voltaje del canal $\text{Ca}_v3.3$.

El bloqueo por amilorida a diferentes potenciales de mantenimiento revela un efecto contrastante sobre los canales $\text{Ca}_v3.1$ y $\text{Ca}_v3.3$. El bloqueo de los canales $\text{Ca}_v3.1$ fue mayor a HPs positivos (por ejemplo -70 mV) que a HP más negativos (-100 mV); lo contrario sucedió para los canales $\text{Ca}_v3.3$ (**Fig. 15**). Por su parte los canales $\text{Ca}_v3.2$ experimentaron el mismo porcentaje de bloqueo en el intervalo de HPs explorados. Estos resultados sugieren que la afinidad de la amilorida por los canales $\text{Ca}_v3.1$ aumenta cuando estos se encuentran en el estado inactivado (HPs más positivos que -100 mV), por el contrario, el estado inactivado de los canales $\text{Ca}_v3.3$ constituye una conformación para la cual disminuye la afinidad de la amilorida. Los resultados anteriores demuestran que la amilorida presenta diferente afinidad por el estado inactivado de los canales Ca_v3 como se ha visto con otros bloqueadores clásicos de canales de calcio (Freeze *et al.*, 2006; Drigelova *et al.*, 2009). Estos resultados sugieren la existencia de sitios de interacción que se ocultan o se exponen a consecuencia de un estado determinado del canal.

Vinculado con lo mencionado en el párrafo anterior, la inactivación en el estado estacionario de los canales $\text{Ca}_v3.1$ se modificó de manera sustancial por la presencia de amilorida (el V_{50} se desplazó 6 mV hacia voltajes más negativos), mientras que los canales $\text{Ca}_v3.2$ y $\text{Ca}_v3.3$ no sufrieron cambios importantes o fueron muy discretos en dicho parámetro (**Tabla 3**). Estos resultados sugieren que la amilorida incrementa significativamente la proporción de los canales inactivados presentes a cualquier valor de V_m (por ej., a -80 mV aumento de 35% en la condición control, a un 60% en presencia de amilorida; **Fig. 17B**); en consecuencia, habrá una menor disponibilidad de canales para ser activados en presencia de amilorida. En otras palabras, la amilorida promueve la estabilización de los canales $\text{Ca}_v3.1$ en el estado inactivado.

Otro resultado interesante del presente trabajo de tesis fue la demostración de que la amilorida exhibe un moderado bloqueo dependiente del uso del canal, pero sólo para los canales $Ca_v3.1$ y en menor grado para $Ca_v3.2$ (**Fig. 16**). Varios bloqueadores de canales de calcio inhiben más efectivamente las corrientes cuando los canales son activados a altas frecuencias, debido a que bajo esta condición se promueve el estado abierto del canal y por lo tanto una mayor probabilidad para el bloqueador de alcanzar su sitio de unión en dicho estado, si lo hubiere. Este bloqueo uso-dependiente de la amilorida hacia los canales Ca_v3 nativos ha sido evaluado en miocitos ventriculares de cuido (Tytgat *et al.*, 1990), en donde se encontró que no existe tal efecto, no obstante, en dicho estudio sólo se exploró una frecuencia de 0.2 Hz. Interesantemente, en las células de corazón el canal $Ca_v3.2$ es el más abundante (Williams *et al.*, 1999) y como muestran los resultados de la presente disertación el bloqueo uso-dependiente fue bastante discreto en este canal en particular (**Fig. 16**). A la fecha no existe información sobre el efecto uso dependiente de la amilorida sobre los canales Ca_v3 recombinantes, por lo que nuestros resultados son los primeros que muestran dicho efecto. Así, la amilorida parece interactuar con sitios de unión en los canales Ca_v3 que son más accesibles en el estado abierto del canal.

Otra serie de experimentos demostró que el efecto de la amilorida sobre la actividad de los canales Ca_v3 no involucra su interacción con el estado cerrado del canal (**Fig. 18**). Es importante aclarar que estos experimentos se realizaron únicamente en los canales $Ca_v3.3$, ya que las corrientes salientes a través de dichos canales son bastante prominentes, premisa necesaria para estudiar el efecto de la amilorida sobre el estado cerrado de los canales con el protocolo empleado (**Fig. 18**). Un reporte previo demostró que el bloqueo de los canales $Ca_v3.1$ por el ion inorgánico Y^{3+} incluye la interacción de éste con el estado cerrado de los canales (Obejero-Paz *et al.*, 2004). En resumen, nuestros resultados demuestran que el mecanismo por el cual la amilorida bloquea la actividad de los canales Ca_v3 involucra su interacción con el estado abierto e inactivado del canal, sin efectos sobre el estado cerrado del canal, aunque como ya se ha revisado en los párrafos previos los efectos no son los mismos para los tres canales Ca_v3 .

7.3. Efecto de la amilorida sobre la cinética de los canales Ca_v3

Antes de obstruir el poro del canal, algunos agentes bloqueadores inhiben las corrientes iónicas por el retardo o aceleramiento de las transiciones entre el estado cerrado y abierto del canal. Por ejemplo, los lantánidos reducen las corrientes de canales de potasio dependientes de voltaje, por un marcado retardo en la velocidad de activación del canal (Enyeart *et al.*, 1998). Con la finalidad de ilustrar los efectos de la amilorida sobre la cinética de activación de los canales Ca_v3 , en la **Fig. 22** se muestran los esquemas básicos del funcionamiento de cada canal estudiado. Debido a que la cinética de activación de los canales $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$ no se modificó en presencia de amilorida, pero la de los $Ca_v3.3$ si se enlenteció en presencia de amilorida a determinados valores de V_m (**Fig. 12**), entonces en los primeros dos el valor de K_1 (o $1/\tau_{\text{activación}}$) no varía, lo que si sucede para los canales $Ca_v3.3$. Lo anterior indica que un efecto sobre la cinética de activación por parte de la amilorida no contribuye a la inhibición de los canales $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$, pero si para $Ca_v3.3$.

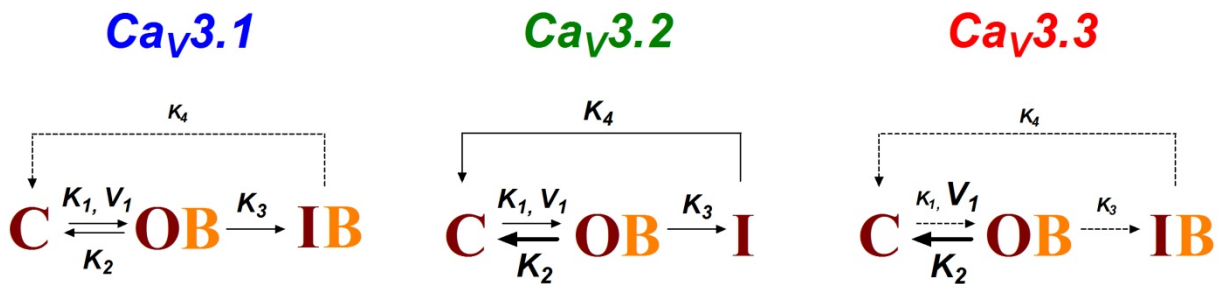


Figura 22. Modelo cinético del efecto de la amilorida en los canales Ca_v3 . Se esquematizan los estados cerrado (C), abierto (O) e inactivado (I) de los canales; las transiciones entre los diferentes estados son reguladas por constantes cinéticas K , cuyo valor es igual al inverso de la constante de tiempo (τ) de la transición en cuestión. Por ejemplo, $K_1 = 1 / \tau_{\text{activación}}$. Además la dependencia al voltaje de la apertura de los canales se indica como V_1 . El bloqueador amilorida se indica con la letra B. Los cambios en los valores de τ por efecto de la amilorida se indican con líneas punteadas (cuando τ aumento) o con líneas gruesas (cuando τ disminuyó). Consecuentemente, el tamaño de las constantes cinéticas K se indica en sentido opuesto. El único cambio en dependencia en voltaje de la apertura de los canales a consecuencia de la amilorida se observó en los canales $Ca_v3.3$, lo cual se ilustra con un aumento en el tamaño del término V_1 .

La amilorida tampoco afecta la cinética de inactivación (K_3) de los canales $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$, lo cual sugiere que el fármaco no afecta la transición del estado abierto de estos canales al estado inactivado. Por el contrario, el proceso de inactivación del canal $Ca_v3.3$

se retarda por acción de la amilorida (**Fig. 12**), indicando una alteración en la transición del estado abierto al estado inactivado (**Fig. 22**). Por otra parte, la amilorida aceleró la velocidad de cierre o desactivación (K_2) de los canales $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$, pero no así para los canales $Ca_v3.1$ (**Fig. 13**). Un incremento en la velocidad de desactivación (transición del estado abierto al estado cerrado del canal) a consecuencia de la presencia de la amilorida sugiere que el fármaco desestabiliza el estado abierto del canal lo cual repercute en una transición más rápida hacia el estado cerrado (**Fig. 22**).

El curso temporal de la recuperación de la inactivación (K_4) de los canales $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.3$ indica un retardo bajo la presencia de amilorida; a diferencia de los canales $Ca_v3.2$, cuya constante de tiempo de recuperación no se modificó significativamente (**Fig. 20, Tabla 4**). Esta observación sugiere que la amilorida interacciona con el estado inactivado de los canales $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.3$ de tal manera que retrasa la transición del estado inactivado al estado cerrado del canal (**Fig. 22**). Por otra parte, los resultados obtenidos a partir del bloqueo dependiente del HP (**Fig. 15**), así como los de la recuperación de la inactivación (**Fig. 20**), sugieren que la amilorida no interacciona con el estado inactivado de los canales $Ca_v3.2$.

7.4. Aportaciones del acoplamiento molecular al mecanismo de bloqueo de los canales Ca_v3 por la amilorida

La falta de estructuras cristalográficas de los canales Ca_v3 ha representado un inconveniente para determinar los sitios específicos de la proteína, a los cuales se unen los bloqueadores disponibles para estos canales. No obstante, en el presente trabajo de tesis se atacó esta limitante mediante el modelado molecular de una determinada región (dominio del poro) de la proteína de los canales Ca_v3 y con ellos se realizó un estudio de acoplamiento molecular con la amilorida (**Fig. 19**). Esta metodología ha sido empleada satisfactoriamente en otros trabajos para ubicar posibles sitios de interacción entre los canales iónicos y diversos ligandos (Lipkind & Fozzard, 2003; Andreotti *et al.*, 2005; Qadri *et al.*, 2010; Sander *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis sugieren la existencia de sitios de interacción en regiones relativamente cercanas al poro de los canales Ca_v3 . Adicionalmente, los parámetros de energía y distancia

proporcionados por el *docking* para cada una de las combinaciones canal/ligando fueron consistentes con la potencia de la amilorida para bloquear los canales Ca_v3 (**Fig. 19B**). De manera sobresaliente, la localización de los probables sitios de unión donde la amilorida interacciona con los canales Ca_v3 como resultado del *docking*, reveló un sitio de unión a la amilorida de baja afinidad en la cara intracelular del canal $Ca_v3.2$ (**Fig. 19A**). La evidencia experimental de la existencia de tal sitio se obtuvo al incluir el fármaco (200 μ M) en la pipeta de registro de tal manera que éste pudiera acceder directamente al ambiente intracelular, como resultado de esta maniobra experimental se observó un bloqueo equivalente solamente a la sexta parte del que se observó cuando la amilorida se aplicó en la solución externa (**Fig. 21B, Tabla 5**). Por el contrario, los canales $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.3$ fueron igualmente sensibles al bloqueo de la amilorida independientemente de la ubicación del fármaco.

En el mismo tenor, la recuperación de la inactivación de los canales $Ca_v3.2$ tampoco se modificó por la presencia de la amilorida extracelular, a diferencia de los canales $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.3$, cuyo curso temporal de recuperación fue sustancialmente enlentecido (**Fig. 20 y Tabla 4**). Como ya se ha mencionado anteriormente, esta propiedad biofísica de los canales Ca_v3 podría tener su sustrato molecular en regiones intracelulares de la proteína del canal (Staes *et al.*, 2001; Arias *et al.*, 2008; Baumgart *et al.*, 2008). Por lo tanto, el resultado anterior refuerza nuestra percepción de que el efecto de la amilorida sobre el canal $Ca_v3.2$ se debe principalmente a su interacción con un sitio de alta afinidad ubicado en la región extracelular del canal. Es importante hacer notar en este punto, que el sitio referido de “alta afinidad” se denomina así al compararlo con los posibles sitios de unión en los canales $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.3$, e incluso con el de la cara intracelular del mismo canal $Ca_v3.2$, no obstante existe una sustancial diferencia con el sitio de unión de la amilorida en los canales ENaC, cuya IC_{50} es menor a 1 μ M (Kleyman *et al.*, 1999).

VIII. CONCLUSIONES

- La amilorida bloquea de manera diferencial a los canales de la familia Ca_v3 ; el canal $Ca_v3.2$ es el más sensible.
- El bloqueo por la amilorida fue dependiente de voltaje únicamente en los canales $Ca_v3.3$, cuya relación corriente voltaje ($I-V$) se desplazó 7 mV en dirección despolarizante.
- Los canales $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.3$ presentan un bloqueo dependiente del estado de inactivación del canal. Cuando los canales se encuentran en el estado inactivado, el porcentaje de bloqueo por amilorida es mayor en los canales $Ca_v3.1$ y menor en los $Ca_v3.3$.
- El mecanismo de bloqueo de la amilorida involucra un moderado efecto uso-dependiente del canal, principalmente en los $Ca_v3.1$.
- La amilorida modificó selectivamente la curva de inactivación en el estado estacionario de los canales $Ca_v3.1$, promoviendo que estos canales se inactiven a voltajes más negativos con respecto a la situación control.
- La amilorida no parece interactuar con el estado cerrado de los canales $Ca_v3.3$.
- La interacción de la amilorida con las proteínas de los canales $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.3$ promueve un estado inactivado más estable, evidenciado por un retardo en el curso temporal de recuperación de la inactivación.
- La amilorida bloquea las corrientes de los canales $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.3$ en la misma proporción actuando desde el exterior o el interior de la célula. Sin embargo, el sitio de unión de más alta afinidad para la amilorida en la proteína del canal $Ca_v3.2$ es más accesible desde el lado extracelular.
- El uso de estrategias bioinformáticas como el modelado por homología y el acoplamiento molecular permitieron obtener información sobre la probable localización de los sitios de unión de la amilorida en los canales Ca_v3 , por lo que representan herramientas poderosas para el diseño de potenciales inhibidores específicos de los canales de calcio dependientes de voltaje, específicamente de los canales Ca_v3 .

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abeliovich, H. 2005. An empirical extremum principle for the hill coefficient in ligand-protein interactions showing negative cooperativity. *Biophys J* **89**: 76-79.
- Aidley, D. J., Stanfield, Peter R. 1996. Ion Channels. Cambridge, Cambridge University Press.
- Andreotti, N., di Luccio, E., Sampieri, F., De Waard, M. & Sabatier, J. M. 2005. Molecular modeling and docking simulations of scorpion toxins and related analogs on human SKCa2 and SKCa3 channels. *Peptides* **26**: 1095-1108.
- Arias, O., II, Vitko, I., Fortuna, M., Baumgart, J. P., Sokolova, S., Shumilin, I. A., *et al.* 2008. Characterization of the gating brake in the I-II loop of Ca(v)3.2 T-type Ca(2+) channels. *J Biol Chem* **283**: 8136-8144.
- Arikkath, J. & Campbell, K. P. 2003. Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol* **13**: 298-307.
- Armstrong, C. M. 1971. Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons. *J Gen Physiol* **59**: 413-437.
- Armstrong, C. M. 2007. Life among the axons. *Annu Rev Physiol* **69**: 1-18.
- Armstrong, C. M. & Matteson, D. R. 1985. Two distinct populations of calcium channels in a clonal line of pituitary cells. *Science* **227**: 65-67.
- Arnoult, C., Villaz, M. & Florman, H. M. 1998. Pharmacological properties of the T-type Ca₂₊ current of mouse spermatogenic cells. *Mol Pharmacol* **53**: 1104-1111.
- Arteaga, R. 2007. Papel del triptófano en la región AID de los canales de calcio HVA en la modulación del canal de calcio alfa1G por subunidades beta. Thesis. UNAM. México.
- Bauer, C. S., Tran-Van-Minh, A., Kadurin, I. & Dolphin, A. C. 2010. A new look at calcium channel alpha2delta subunits. *Curr Opin Neurobiol* **20**: 563-571.
- Baumgart, J. P., Vitko, I., Bidaud, I., Kondratskyi, A., Lory, P. & Perez-Reyes, E. 2008. I-II loop structural determinants in the gating and surface expression of low voltage-activated calcium channels. *PLoS One* **3**: e2976.
- Bean, B. P. 1989. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol* **51**: 367-384.
- Bean, R. C., Shepherd, W. C., Chan, H. & Eichner, J. 1969. Discrete conductance fluctuations in lipid bilayer protein membranes. *J Gen Physiol* **53**: 741-757.
- Beedle, A. M., Hamid, J. & Zamponi, G. W. 2002. Inhibition of transiently expressed low- and high-voltage-activated calcium channels by trivalent metal cations. *J Membr Biol* **187**: 225-238.
- Benos, D. J. 1982. Amiloride: a molecular probe of sodium transport in tissues and cells. *Am J Physiol* **242**: C131-145.
- Benos, D. J. & Stanton, B. A. 1999. Functional domains within the degenerin/epithelial sodium channel (Deg/ENaC) superfamily of ion channels. *J Physiol* **520 Pt 3**: 631-644.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D. & Roderick, H. L. 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 517-529.
- Bhalla, V. & Hallows, K. R. 2008. Mechanisms of ENaC regulation and clinical implications. *J Am Soc Nephrol* **19**: 1845-1854.
- Bicking, J. B., Mason, J. W., Woltersdorf, O. W., Jones, J. H., Kwong, S. F., Robb, C. M., *et al.* 1965. Pyrazine Diuretics. I. N-Amidino-3-amino-6-halopyrazinecarboxamides. *J Med Chem* **8**: 638-642.
- Brooks, S. P. & Storey, K. B. 1992. Bound and determined: a computer program for making buffers of defined ion concentrations. *Anal Biochem* **201**: 119-126.
- Brown, T. H. & Cooper, D. G. 1995. Novel phenyl (alkyl/alkoxy) 1-aminoalkyl substituted piperidines and pyrrolidines as calcium channel antagonists. PCT/EP95/00850(WO 95/24390).
- Burgess, D. E., Crawford, O., Delisle, B. P. & Satin, J. 2002. Mechanism of inactivation gating of human T-type (low-voltage activated) calcium channels. *Biophys J* **82**: 1894-1906.
- Carbone, E. & Lux, H. D. 1984. A low voltage-activated calcium conductance in embryonic chick sensory neurons. *Biophys J* **46**: 413-418.
- Catterall, W. A. 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca₂₊ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 521-555.
- Ciampolillo, F., McCoy, D. E., Green, R. B., Karlson, K. H., Dagenais, A., Molday, R. S., *et al.* 1996. Cell-specific expression of amiloride-sensitive, Na(+)-conducting ion channels in the kidney. *Am J Physiol* **271**: C1303-1315.
- Conti-Tronconi, B. M. & Raftery, M. A. 1982. The nicotinic cholinergic receptor: correlation of molecular structure with functional properties. *Annu Rev Biochem* **51**: 491-530.

- Corvalan, V. C., R. de Vellis, J. and Hagiwara, S. 1990. Neuronal modulation of calcium channel activity in cultured rat astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 4345-4348.
- Costanzo, L. S. 1984. Comparison of calcium and sodium transport in early and late rat distal tubules: effect of amiloride. *Am J Physiol* **246**: F937-945.
- Coulter, D. A., Huguenard, J. R. & Prince, D. A. 1989. Calcium currents in rat thalamocortical relay neurones: kinetic properties of the transient, low-threshold current. *J Physiol* **414**: 587-604.
- Cribbs, L. L., Gomora, J. C., Daud, A. N., Lee, J. H. & Perez-Reyes, E. 2000. Molecular cloning and functional expression of Ca(v)3.1c, a T-type calcium channel from human brain. *FEBS Lett* **466**: 54-58.
- Cribbs, L. L., Lee, J. H., Yang, J., Satin, J., Zhang, Y., Daud, A., *et al.* 1998. Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca²⁺ channel gene family. *Circ Res* **83**: 103-109.
- Chemin, J., Monteil, A., Perez-Reyes, E., Bourinet, E., Nargeot, J. & Lory, P. 2002. Specific contribution of human T-type calcium channel isoforms (alpha(1G), alpha(1H) and alpha(1I)) to neuronal excitability. *J Physiol* **540**: 3-14.
- Darszon, A., Lopez-Martinez, P., Acevedo, J. J., Hernandez-Cruz, A. & Trevino, C. L. 2006. T-type Ca²⁺ channels in sperm function. *Cell Calcium* **40**: 241-252.
- Davies, A., Hendrich, J., Van Minh, A. T., Wratten, J., Douglas, L. & Dolphin, A. C. 2007. Functional biology of the alpha(2)delta subunits of voltage-gated calcium channels. *Trends Pharmacol Sci* **28**: 220-228.
- Dolphin, A. C., Wyatt, C. N., Richards, J., Beattie, R. E., Craig, P., Lee, J. H., *et al.* 1999. The effect of alpha2-delta and other accessory subunits on expression and properties of the calcium channel alpha1G. *J Physiol* **519 Pt 1**: 35-45.
- Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., *et al.* 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**: 69-77.
- Drigelova, M., Tarabova, B., Duburs, G. & Lacinova, L. 2009. The dihydropyridine analogue cerebrocrast blocks both T-type and L-type calcium currents. *Can J Physiol Pharmacol* **87**: 923-932.
- Dubel, S. J., Altier, C., Chaumont, S., Lory, P., Bourinet, E. & Nargeot, J. 2004. Plasma membrane expression of T-type calcium channel alpha(1) subunits is modulated by high voltage-activated auxiliary subunits. *J Biol Chem* **279**: 29263-29269.
- Duc, C., Farman, N., Canessa, C. M., Bonvalet, J. P. & Rossier, B. C. 1994. Cell-specific expression of epithelial sodium channel alpha, beta, and gamma subunits in aldosterone-responsive epithelia from the rat: localization by in situ hybridization and immunocytochemistry. *J Cell Biol* **127**: 1907-1921.
- Dunham, I., Shimizu, N., Roe, B. A., Chisoe, S., Hunt, A. R., Collins, J. E., *et al.* 1999. The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature* **402**: 489-495.
- Eaton, D. C. & Brodwick, M. S. 1980. Effects of barium on the potassium conductance of squid axon. *J Gen Physiol* **75**: 727-750.
- Edgerton, G. B., Blumenthal, K. M. & Hanck, D. A. 2010. Inhibition of the activation pathway of the T-type calcium channel Ca(V)3.1 by ProTxII. *Toxicon* **56**: 624-636.
- Edwards, C., Lorkovic, H. & Weber, A. 1966. The effect of the replacement of calcium by strontium on excitation-contraction coupling in frog skeletal muscle. *J Physiol* **186**: 295-306.
- Enyeart, J. J., Biagi, B. A. & Mlinar, B. 1992. Preferential block of T-type calcium channels by neuroleptics in neural crest-derived rat and human C cell lines. *Mol Pharmacol* **42**: 364-372.
- Enyeart, J. J., Xu, L., Gomora, J. C. & Enyeart, J. A. 1998. Modulation of IA potassium current in adrenal cortical cells by a series of ten lanthanide elements. *J Membr Biol* **164**: 139-153.
- Ertel, E. A., Campbell, K. P., Harpold, M. M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., *et al.* 2000. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* **25**: 533-535.
- Fatt, P. & Ginsborg, B. L. 1958. The ionic requirements for the production of action potentials in crustacean muscle fibres. *J Physiol* **142**: 516-543.
- Fiser, A. & Sali, A. 2003. Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models. *Methods Enzymol* **374**: 461-491.
- Flanagan, R. J. 1998. Guidelines for the interpretation of analytical toxicology results and unit of measurement conversion factors. *Ann Clin Biochem* **35 (Pt 2)**: 261-267.
- Frazier, C. J., Serrano, J. R., George, E. G., Yu, X., Viswanathan, A., Perez-Reyes, E., *et al.* 2001. Gating kinetics of the alpha1I T-type calcium channel. *J Gen Physiol* **118**: 457-470.

- Freeze, B. S., McNulty, M. M. & Hanck, D. A. 2006. State-dependent verapamil block of the cloned human Ca(v)3.1 T-type Ca(2+) channel. *Mol Pharmacol* **70**: 718-726.
- Fukushima, Y. & Hagiwara, S. 1983. Voltage-gated Ca²⁺ channel in mouse myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 2240-2242.
- Fukushima, Y., Hagiwara, S. Saxton, R.E. 1984. Variation of calcium current during the cell growth cycle in mouse hybridoma lines secreting immunoglobulins. *J Physiol* **355**: 313-321.
- Garty, H. & Palmer, L. G. 1997. Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol Rev* **77**: 359-396.
- Geduldig, D. & Junge, D. 1968. Sodium and calcium components of action potentials in the Aplysia giant neurone. *J Physiol* **199**: 347-365.
- George, A. L., Jr. 2005. Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *J Clin Invest* **115**: 1990-1999.
- Gomora, J. C., Daud, A. N., Weiergraber, M. & Perez-Reyes, E. 2001. Block of cloned human T-type calcium channels by succinimide antiepileptic drugs. *Mol Pharmacol* **60**: 1121-1132.
- Gomora, J. C., Enyeart, J. A. & Enyeart, J. J. 1999. Mibefradil potently blocks ATP-activated K(+) channels in adrenal cells. *Mol Pharmacol* **56**: 1192-1197.
- Gomora, J. C., Murbartian, J., Arias, J. M., Lee, J. H. & Perez-Reyes, E. 2002. Cloning and expression of the human T-type channel Ca(v)3.3: insights into prepulse facilitation. *Biophys J* **83**: 229-241.
- Gomora, J. C., Xu, L., Enyeart, J. A. & Enyeart, J. J. 2000. Effect of mibefradil on voltage-dependent gating and kinetics of T-type Ca(2+) channels in cortisol-secreting cells. *J Pharmacol Exp Ther* **292**: 96-103.
- Goodman, A. G. 2003. Goodman & Gilman
Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica Mc Graw Hill
Interamericana Editores S.A. de C.V.
- Guy, H. R. & Seetharamulu, P. 1986. Molecular model of the action potential sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 508-512.
- Hagiwara, S. & Kidokoro, Y. 1971. Na and Ca components of action potential in amphioxus muscle cells. *J Physiol* **219**: 217-232.
- Hagiwara, S., Miyazaki, S., Moody, W. & Patlak, J. 1978. Blocking effects of barium and hydrogen ions on the potassium current during anomalous rectification in the starfish egg. *J Physiol* **279**: 167-185.
- Hagiwara, S. O., H. 1983. Studies of single calcium channel currents in rat clonal pituitary cells. *J Physiol* **336**: 649-661.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F. J. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* **391**: 85-100.
- Hansen, J. P., Chen, R. S., Larsen, J. K., Chu, P. J., Janes, D. M., Weis, K. E., et al. 2004. Calcium channel gamma6 subunits are unique modulators of low voltage-activated (Cav3.1) calcium current. *J Mol Cell Cardiol* **37**: 1147-1158.
- Hausser, M. 2000. The Hodgkin-Huxley theory of the action potential. *Nat Neurosci* **3 Suppl**: 1165.
- Heady, T. N., Gomora, J. C., Macdonald, T. L. & Perez-Reyes, E. 2001. Molecular pharmacology of T-type Ca²⁺ channels. *Jpn J Pharmacol* **85**: 339-350.
- Herrington, J. & Lingle, C. J. 1992. Kinetic and pharmacological properties of low voltage-activated Ca²⁺ current in rat clonal (GH3) pituitary cells. *J Neurophysiol* **68**: 213-232.
- Higueldo, J. F. 2007. Efecto de las subunidades beta de los canales HVA sobre el canal Cav3.3 Thesis. UAEM. México.
- Hille, B. 2001. Ion Channels of Excitable Membranes. Washington, Sinauer Associates.
- Hirano, Y., Fozzard, H. A. & January, C. T. 1989. Characteristics of L- and T-type Ca²⁺ currents in canine cardiac Purkinje cells. *Am J Physiol* **256**: H1478-1492.
- Hladky, S. B. a. H., D.A. 1970. *Nature* **225**: 451-453.
- Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. 1952a. The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo. *J Physiol* **116**: 473-496.
- Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. 1952b. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. *J Physiol* **116**: 449-472.
- Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. 1952c. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* **117**: 500-544.
- Hodgkin, A. L., Huxley, A. F. & Katz, B. 1952. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. *J Physiol* **116**: 424-448.
- Huguenard, J. R. 2004. T-Channel Defects in Patients with Childhood Absence Epilepsy. *Epilepsy Curr* **4**: 7-8.

- Huguenard, J. R., Gutnick, M. J. & Prince, D. A. 1993. Transient Ca²⁺ currents in neurons isolated from rat lateral habenula. *J Neurophysiol* **70**: 158-166.
- Huguenard, J. R. & Prince, D. A. 1992. A novel T-type current underlies prolonged Ca(2+)-dependent burst firing in GABAergic neurons of rat thalamic reticular nucleus. *J Neurosci* **12**: 3804-3817.
- Jasti, J., Furukawa, H., Gonzales, E. B. & Gouaux, E. 2007. Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature* **449**: 316-323.
- Ji, H., Delker, S. L., Li, H., Martasek, P., Roman, L. J., Poulos, T. L., *et al.* 2010. Exploration of the active site of neuronal nitric oxide synthase by the design and synthesis of pyrrolidinomethyl 2-aminopyridine derivatives. *J Med Chem* **53**: 7804-7824.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B. T., *et al.* 2003a. X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* **423**: 33-41.
- Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A. & MacKinnon, R. 2003b. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* **423**: 42-48.
- Kang, M. G. & Campbell, K. P. 2003. Gamma subunit of voltage-activated calcium channels. *J Biol Chem* **278**: 21315-21318.
- Katz, B. & Miledi, R. 1967. The timing of calcium action during neuromuscular transmission. *J Physiol* **189**: 535-544.
- Katzung, B. G. 2001. Basic & Clinical Pharmacology, Lange Medical Books/Mc Graw Hill.
- Kim, D., Song, I., Keum, S., Lee, T., Jeong, M. J., Kim, S. S., *et al.* 2001. Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to absence seizures in mice lacking alpha(1G) T-type Ca(2+) channels. *Neuron* **31**: 35-45.
- Kleyman, T. R. & Cragoe, E. J., Jr. 1988. Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *J Membr Biol* **105**: 1-21.
- Kleyman, T. R., Sheng, S., Kosari, F. & Kieber-Emmons, T. 1999. Mechanism of action of amiloride: a molecular prospective. *Semin Nephrol* **19**: 524-532.
- Klockner, U., Lee, J. H., Cribbs, L. L., Daud, A., Hescheler, J., Pereverzev, A., *et al.* 1999. Comparison of the Ca²⁺ currents induced by expression of three cloned alpha1 subunits, alpha1G, alpha1H and alpha1I, of low-voltage-activated T-type Ca²⁺ channels. *Eur J Neurosci* **11**: 4171-4178.
- Klugbauer, N., Marais, E., Lacinova, L. & Hofmann, F. 1999. A T-type calcium channel from mouse brain. *Pflugers Arch* **437**: 710-715.
- Koeppen, B. M. 1986. Conductive properties of the rabbit outer medullary collecting duct: outer stripe. *Am J Physiol* **250**: F70-76.
- Krayenbuhl, J. C., Vozeh, S., Kondo-Oestreicher, M. & Dayer, P. 1999. Drug-drug interactions of new active substances: mibefradil example. *Eur J Clin Pharmacol* **55**: 559-565.
- Lacinova, L. 2004. Pharmacology of recombinant low-voltage activated calcium channels. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **3**: 105-111.
- Lacinova, L., Klugbauer, N. & Hofmann, F. 2000. Regulation of the calcium channel alpha(1G) subunit by divalent cations and organic blockers. *Neuropharmacology* **39**: 1254-1266.
- Lee, H. C., Wang, J. M. & Swartz, K. J. 2003. Interaction between extracellular Hanatoxin and the resting conformation of the voltage-sensor paddle in Kv channels. *Neuron* **40**: 527-536.
- Lee, J. H., Daud, A. N., Cribbs, L. L., Lacerda, A. E., Pereverzev, A., Klockner, U., *et al.* 1999a. Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J Neurosci* **19**: 1912-1921.
- Lee, J. H., Gomora, J. C., Cribbs, L. L. & Perez-Reyes, E. 1999b. Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block alpha1H. *Biophys J* **77**: 3034-3042.
- Lenaeus, M. J., Vamvouka, M., Focia, P. J. & Gross, A. 2005. Structural basis of TEA blockade in a model potassium channel. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 454-459.
- Lipkind, G. M. & Fozzard, H. A. 2003. Molecular modeling of interactions of dihydropyridines and phenylalkylamines with the inner pore of the L-type Ca²⁺ channel. *Mol Pharmacol* **63**: 499-511.
- Lipscombe, D. 2001. Ion Channels. *Encyclopedia of Life Sciences*: 1-9.
- Martin, R. L., Lee, J. H., Cribbs, L. L., Perez-Reyes, E. & Hanck, D. A. 2000. Mibefradil block of cloned T-type calcium channels. *J Pharmacol Exp Ther* **295**: 302-308.
- McNaughton, N. C., Hainsworth, A. H., Green, P. J. & Randall, A. D. 2000a. Inhibition of recombinant low-voltage-activated Ca(2+) channels by the neuroprotective agent BW619C89 (Sipatrigine). *Neuropharmacology* **39**: 1247-1253.

- McNaughton, N. C., Warre, R., Cooper, D. G., Nasir, S., Ranson, J. L. & Randall, A. 2000b. Potent inhibition of a recombinant low voltage-activated Ca²⁺ channel by SB-209712. *Eur J Pharmacol* **407**: 53-60.
- Miller, C., Moczydlowski, E., Latorre, R. & Phillips, M. 1985. Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca²⁺-activated K⁺ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature* **313**: 316-318.
- Miller, D. J. 2004. Sydney Ringer; physiological saline, calcium and the contraction of the heart. *J Physiol* **555**: 585-587.
- Mitterdorfer, J., Grabner, M., Kraus, R. L., Hering, S., Prinz, H., Glossmann, H., *et al.* 1998. Molecular basis of drug interaction with L-type Ca²⁺ channels. *J Bioenerg Biomembr* **30**: 319-334.
- Mizuta, E., Shirai, M., Arakawa, K., Hidaka, K., Miake, J., Ninomiya, H., *et al.* 2010. Different distribution of Cav3.2 and Cav3.1 transcripts encoding T-type Ca²⁺ channels in the embryonic heart of mice. *Biomed Res* **31**: 301-305.
- Monteil, A., Chemin, J., Bourinet, E., Mennessier, G., Lory, P. & Nargeot, J. 2000a. Molecular and functional properties of the human alpha(1G) subunit that forms T-type calcium channels. *J Biol Chem* **275**: 6090-6100.
- Monteil, A., Chemin, J., Leuranguer, V., Altier, C., Mennessier, G., Bourinet, E., *et al.* 2000b. Specific properties of T-type calcium channels generated by the human alpha 1I subunit. *J Biol Chem* **275**: 16530-16535.
- Mudado, M. A., Rodrigues, A. L., Prado, V. F., Beirao, P. S. & Cruz, J. S. 2004. CaV 3.1 and CaV 3.3 account for T-type Ca²⁺ current in GH3 cells. *Braz J Med Biol Res* **37**: 929-935.
- Mueller, P., Rudin, D. O., Tien, H. T. & Wescott, W. C. 1962. Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. *Nature* **194**: 979-980.
- Neher, E. a. S., B. 1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**: 799-802.
- Nelson, M. T. 1986. Interactions of divalent cations with single calcium channels from rat brain synaptosomes. *J Gen Physiol* **87**: 201-222.
- Nilius, B., Hess, P., Lansman, J. B. & Tsien, R. W. 1985. A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature* **316**: 443-446.
- Noda, M., Furutani, Y., Takahashi, H., Toyosato, M., Tanabe, T., Shimizu, S., *et al.* 1983a. Cloning and sequence analysis of calf cDNA and human genomic DNA encoding alpha-subunit precursor of muscle acetylcholine receptor. *Nature* **305**: 818-823.
- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., *et al.* 1984. Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* **312**: 121-127.
- Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosato, M., Kikuyotani, S., Hirose, T., *et al.* 1983b. Primary structures of beta- and delta-subunit precursors of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequences. *Nature* **301**: 251-255.
- Nowycky, M. C., Fox, A. P. & Tsien, R. W. 1985. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* **316**: 440-443.
- Obejero-Paz, C. A., Gray, I. P. & Jones, S. W. 2004. Y3⁺ block demonstrates an intracellular activation gate for the alpha1G T-type Ca²⁺ channel. *J Gen Physiol* **124**: 631-640.
- Palmer, L. G. 1984. Voltage-dependent block by amiloride and other monovalent cations of apical Na channels in the toad urinary bladder. *J Membr Biol* **80**: 153-165.
- Perchenet, L., Benardeau, A. & Ertel, E. A. 2000. Pharmacological properties of Ca(V)3.2, a low voltage-activated Ca²⁺ channel cloned from human heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **361**: 590-599.
- Perez-Reyes, E. 1999. Three for T: molecular analysis of the low voltage-activated calcium channel family. *Cell Mol Life Sci* **56**: 660-669.
- Perez-Reyes, E. 2003. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* **83**: 117-161.
- Perez-Reyes, E., Cribbs, L. L., Daud, A., Lacerda, A. E., Barclay, J., Williamson, M. P., *et al.* 1998. Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* **391**: 896-900.
- Phillips, L. R., Milesescu, M., Li-Smerin, Y., Mindell, J. A., Kim, J. I. & Swartz, K. J. 2005. Voltage-sensor activation with a tarantula toxin as cargo. *Nature* **436**: 857-860.
- Prinz, H. 2009. Hill coefficients, dose-response curves and allosteric mechanisms. *J Chem Biol*.
- Qadri, Y. J., Song, Y., Fuller, C. M. & Benos, D. J. 2010. Amiloride docking to acid-sensing ion channel-1. *J Biol Chem* **285**: 9627-9635.
- Randall, A. & Benham, C. D. 1999. Recent advances in the molecular understanding of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Mol Cell Neurosci* **14**: 255-272.

- Reyes, M. A. M. & González, T. H. 2005. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas México, Thompson PLM, S.A. de C.V.
- Roy, A., Kucukural, A. & Zhang, Y. 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 5: 725-738.
- Sander, T., Bruun, A. T. & Balle, T. 2010. Docking to flexible nicotinic acetylcholine receptors: a validation study using the acetylcholine binding protein. *J Mol Graph Model* 29: 415-424.
- Sanner, M. F. 1999. Python: a programming language for software integration and development. *J Mol Graph Model* 17: 57-61.
- Sather, W. A. & McCleskey, E. W. 2003. Permeation and selectivity in calcium channels. *Annu Rev Physiol* 65: 133-159.
- Spahn, H., Reuter, K., Mutschler, E., Gerok, W. & Knauf, H. 1987. Pharmacokinetics of amiloride in renal and hepatic disease. *Eur J Clin Pharmacol* 33: 493-498.
- Staes, M., Talavera, K., Klugbauer, N., Prenen, J., Lacinova, L., Droogmans, G., *et al.* 2001. The amino side of the C-terminus determines fast inactivation of the T-type calcium channel $\alpha 1G$. *J Physiol* 530: 35-45.
- Stojilkovic, S. S., Tomic, M., He, M. L., Yan, Z., Koshimizu, T. A. & Zemkova, H. 2005. Molecular dissection of purinergic P2X receptor channels. *Ann N Y Acad Sci* 1048: 116-130.
- Takahashi, K., Wakamori, M. & Akaike, N. 1989. Hippocampal CA1 pyramidal cells of rats have four voltage-dependent calcium conductances. *Neurosci Lett* 104: 229-234.
- Talley, E. M., Cribbs, L. L., Lee, J. H., Daud, A., Perez-Reyes, E. & Bayliss, D. A. 1999. Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *J Neurosci* 19: 1895-1911.
- Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., *et al.* 1987. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328: 313-318.
- Tang, C. M., Presser, F. & Morad, M. 1988. Amiloride selectively blocks the low threshold (T) calcium channel. *Science* 240: 213-215.
- Tien, H. T. W. A. H., and Hie Ping Ting 1968. Formation of black lipid membranes (BLM) from extracts of spinach leaves. *Biochem Biophys Res Commun* 33: 207-212.
- Todorovic, S. M. & Jevtovic-Todorovic, V. 2007. Regulation of T-type calcium channels in the peripheral pain pathway. *Channels (Austin)* 1: 238-245.
- Todorovic, S. M., Jevtovic-Todorovic, V., Mennerick, S., Perez-Reyes, E. & Zorumski, C. F. 2001a. $\text{Ca}(v)3.2$ channel is a molecular substrate for inhibition of T-type calcium currents in rat sensory neurons by nitrous oxide. *Mol Pharmacol* 60: 603-610.
- Todorovic, S. M., Jevtovic-Todorovic, V., Meyenburg, A., Mennerick, S., Perez-Reyes, E., Romano, C., *et al.* 2001b. Redox modulation of T-type calcium channels in rat peripheral nociceptors. *Neuron* 31: 75-85.
- Todorovic, S. M. & Lingle, C. J. 1998. Pharmacological properties of T-type Ca^{2+} current in adult rat sensory neurons: effects of anticonvulsant and anesthetic agents. *J Neurophysiol* 79: 240-252.
- Todorovic, S. M., Perez-Reyes, E. & Lingle, C. J. 2000. Anticonvulsants but not general anesthetics have differential blocking effects on different T-type current variants. *Mol Pharmacol* 58: 98-108.
- Tombola, F., Pathak, M. M. & Isacoff, E. Y. 2005. How far will you go to sense voltage? *Neuron* 48: 719-725.
- Tombola, F., Pathak, M. M. & Isacoff, E. Y. 2006. How does voltage open an ion channel? *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 23-52.
- Trott, O. & Olson, A. J. 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 31: 455-461.
- Tyagarajan, S., Chakravarty, P. K., Park, M., Zhou, B., Herrington, J. B., Ratliff, K., *et al.* 2011. A potent and selective indole N-type calcium channel ($\text{Ca}(v)2.2$) blocker for the treatment of pain. *Bioorg Med Chem Lett* 21: 869-873.
- Tytgat, J., Nilius, B., Vereecke, J. & Carmeliet, E. 1988. The T-type Ca channel in guinea-pig ventricular myocytes is insensitive to isoproterenol. *Pflugers Arch* 411: 704-706.
- Tytgat, J., Vereecke, J. & Carmeliet, E. 1990. Mechanism of cardiac T-type Ca channel blockade by amiloride. *J Pharmacol Exp Ther* 254: 546-551.
- Uhlen, P. & Fritz, N. 2010. Biochemistry of calcium oscillations. *Biochem Biophys Res Commun* 396: 28-32.
- Veselovskii, N. S. F., S.A. 1983. 2 types of calcium channels in the somatic membrane of spinal ganglion neurons in the rat. *Dokl Akad Nauk SSSR*. 268: 747-750.

- Williams, M. E., Washburn, M. S., Hans, M., Urrutia, A., Brust, P. F., Prodanovich, P., et al.** 1999. Structure and functional characterization of a novel human low-voltage activated calcium channel. *J Neurochem* **72**: 791-799.
- Woodhull, A. M.** 1973. Ionic blockage of sodium channels in nerve. *J Gen Physiol* **61**: 687-708.
- Wu, J. Y. & Lipsius, S. L.** 1990. Effects of extracellular Mg²⁺ on T- and L-type Ca²⁺ currents in single atrial myocytes. *Am J Physiol* **259**: H1842-1850.
- Yellen, G., Jurman, M. E., Abramson, T. & MacKinnon, R.** 1991. Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K⁺ channel. *Science* **251**: 939-942.
- Zamponi, G.** 2005. Voltage-Gated Calcium Channels. GEORGETOWN, TEXAS. USA, KLUMER ACADEMIC / PLENIUM PUBLISHERS.
- Zhou, Y., Morais-Cabral, J. H., Kaufman, A. & MacKinnon, R.** 2001. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* **414**: 43-48.

APÉNDICE

Breve historia de la excitabilidad celular y los canales iónicos

La electricidad ha fascinado al hombre desde la antigüedad aunque muy poco se comprendía de ella, en la antigua Grecia el filósofo Tales de Mileto (625-547 a.C.) observó que si frotaba una trozo de ámbar con una piel o con lana se podía atraer pequeños objetos, e incluso el frotar mucho tiempo podía causar la aparición de una chispa, después de esta observación, la aportación científica en los siglos posteriores fue casi nula. En la segunda mitad del siglo XVI el físico y médico inglés William Gilbert (1544-1603) fue la primera persona en utilizar la palabra *eléctrico* y a través de sus experiencias clasificó los materiales en conductores y aislantes, además de inventar el primer instrumento eléctrico, el *versorium* (un electroscopio). Las investigaciones de Gilbert fueron continuadas por el físico alemán Otto von Guericke (1602-1686) quien observó una repulsión de cuerpos electrizados luego de haber sido atraídos. En aquellos tiempos Europa sufrió una crisis ideológica tras las guerras de religión, lo que renueva el panorama intelectual a finales del siglo XVII y principios del XVIII. Esto inicia la Ilustración o siglo de las luces, donde surgen nuevas instituciones científicas como la Academia

Real de Londres que emanan un espíritu crítico que se extiende por todo el continente. En este nuevo ambiente intelectual, el físico inglés Stephen Gray (1666-1736) demuestra la conductividad eléctrica de los cuerpos, y en 1729 logra transmitir electricidad a través de un material conductor, poco tiempo después Charles Du Fay (1698-1739) inspirado por las aportaciones de Gray, descubre

que la electricidad se presenta en dos clases, las que él llama *resinosa* y *vítrea*, actualmente conocidas como negativa y positiva respectivamente. Unos años después, en 1745, Pieter van Musschenbroek (1692-1761) con la idea de comprobar si una botella llena de agua podía almacenar cargas eléctricas, inventa la botella de Leyden, la cual es la base de los actuales capacitores eléctricos. Posteriormente a mitad del siglo XVIII, el multifacético Benjamín Franklin (1706-1790) desarrolla una teoría según la cual la

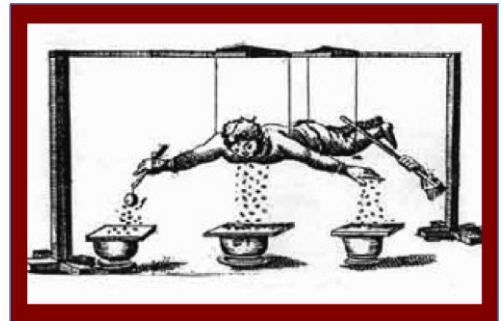


Ilustración 1. Conductividad eléctrica de los cuerpos. Tomado de la Enciclopedia Británica. 2011.

electricidad era un *fluido único existente en toda materia* y clasificó a las sustancias en eléctricamente positivas y eléctricamente negativas de acuerdo con el exceso o defecto de ese fluido; al mismo tiempo Sir William Watson (1715-1787) realiza modificaciones de la botella de Leyden y demuestra que una descarga de electricidad estática es una corriente eléctrica.

En América, dos años después del inicio de la guerra de independencia de los Estados Unidos, Charles Augustin Coulomb (1736-1806) un físico e ingeniero francés inventa la *balanza de torsión* para medir la fuerza de atracción o repulsión que ejercen entre sí dos cargas eléctricas y estableció la función que liga esta fuerza con la distancia. Mientras tanto en Bolonia, Italia, un médico y físico de nombre Luigi Galvani (1737-1798) al realizar la disección de una rana, descubre de forma accidental que al tocar las ancas del animal con un objeto cargado de electricidad se producía una contracción muscular. Después de repetidos experimentos, Galvani se convence de la existencia de una *electricidad animal*, hecho que da inicio a la lucha ideológica con su contemporáneo Alessandro Volta (1745-1827) quien afirmaba que dicho fenómeno sucedía por el contacto de dos materiales conductores, esta controversia obliga a ambos a diseñar experimentos

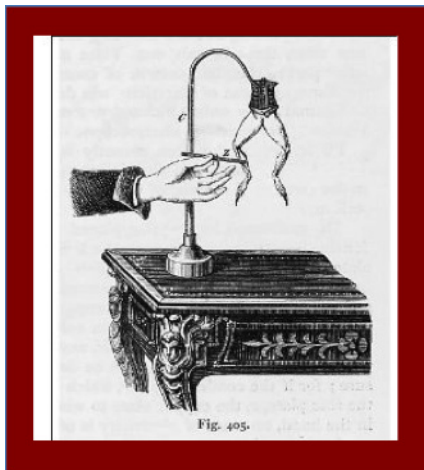


Ilustración 2. "Electricidad animal", Galvani y sus ranas. Tomado de la Enciclopedia Británica, 2011.

muy ingeniosos para probar sus teorías, pero a Galvani lo retiran de sus cargos por negar lealtad al conquistador Napoleón Bonaparte y muere un año después, Volta por el contrario sigue investigando y en 1800 inventa la *pila de volta* lo que cambia por completo el conocimiento sobre la electricidad. Ambos científicos murieron sin saber que sus teorías no eran mutuamente excluyentes y que las dos eran ciertas.

Los estudios sobre la electricidad desde el punto de vista físico continuaron con las aportaciones de Michael Faraday (1791-1867) quien estableció las bases del electromagnetismo en la física y posteriormente Andre Marie Ampere (1775-1836) encuentra la relación entre la electricidad y el magnetismo. Años después Georg Simon Ohm (1789-1854) utiliza la pila de Volta para realizar sus experimentos y determina que existe una relación directamente proporcional entre la

diferencia de potencial aplicado (voltaje) a través de un material conductor y la corriente eléctrica resultante, conocida ahora como la ley de Ohm.

En los siguientes 30 años nadie realizó investigaciones sobre la electricidad animal, hasta que en 1836 un joven físico de nombre Carlo Matteucci (1811-1868) inspirado por los experimentos de Galvani, muestra en el pez torpedo que una estimulación mecánica o un daño de los lóbulos del cerebro del pez son seguidos por una descarga de los órganos eléctricos del animal, este hecho se da a conocer como el primer gran descubrimiento desarrollado por la ciencia italiana: *la identificación del centro nervioso responsable de la descarga del lóbulo eléctrico del pez torpedo*. Posteriormente en 1842 Matteucci descubre *corrientes de demarcación* las cuales fluyen entre la superficie intacta del músculo estriado y la

superficie dañada del mismo, él utiliza una pierna de rana como galvanoscopio y un galvanómetro, con estos instrumentos

demuestra el sentido del flujo de la corriente, tal como se esperaba si la superficie del músculo dañado fuera relativamente negativa con respecto a la superficie intacta. Poco tiempo después, Matteucci realiza el descubrimiento de *corrientes de acción* fenómeno caracterizado por una oscilación negativa del potencial de demarcación, el cual le fue difícil de interpretar, incluso discutió con su contemporáneo Emil du Bois-Reymond (1818-1896) físico alemán, al que se le atribuye la correcta interpretación del fenómeno y el descubrimiento del potencial de acción del nervio, además de ser considerado el padre de la electrofisiología experimental.

Más tarde el farmacólogo inglés Sidney Ringer (1836-1910), realizó una serie de experimentos entre 1882 y 1885 usando una técnica de perfusión de órganos aislados descrita en la década de 1860 por Carl Friedrich Ludwing. Ringer trabajó con corazones de ranas aislados y descubre que el latido del corazón puede continuar fuera del animal por un periodo prolongado de tiempo, si la solución de perfusión contiene sales de sodio, potasio y calcio (Miller, 2004). Al mismo tiempo el científico sueco Svante August



Ilustración 3. Órgano eléctrico del pez torpedo y pierna de rana como galvanoscopio. Tomado de la Enciclopedia Británica, 2011.

Arrhenius (1859-1927) desarrolla la teoría de la existencia del *ión*, producto de la disociación de un compuesto al encontrarse en solución. Un par de años después el físico alemán Walther Nernst (1864-1941) inspirado por la propuesta de disociación iónica de Arrhenius, elucida la teoría de las celdas galvánicas al suponer la presencia de una “*presión electrolítica de disolución*” que obliga a los iones de los electrodos en la solución a moverse y que es opuesta a la presión osmótica de los iones disueltos. En el mismo año, Nernst deriva las ecuaciones que definen las condiciones por las cuales los sólidos precipitan a partir de una solución saturada.

Al inicio del siglo XX un estudiante de Emil du Bois-Reymond de nombre Julius Bernstein (1839-1917), comienza a investigar acerca del potencial de reposo y del potencial de acción de nervios y músculos, y propone que las células excitables están rodeadas por una membrana con permeabilidad selectiva a los iones potasio, cuando están en reposo, y que durante la excitación disminuye la permeabilidad hacia dicho ión y se incrementa hacia otros iones.

Más tarde a mediados de la década de 1920, Herbert Gasser (1888-1963) en colaboración con Joseph Erlanger (1874-1965), ambos norteamericanos, trabajaron con un osciloscopio de rayos catódicos recientemente inventado, con la finalidad de registrar un impulso a lo largo de nervios que contenían fibras de diferentes tamaños. Ellos estimularon eléctricamente un punto determinado del nervio y registraron los cambios en el voltaje en puntos distantes del sitio de estimulación. Sus resultados y la interpretación dada los llevó a concluir que el calibre o diámetro de la fibra nerviosa, estaba relacionada

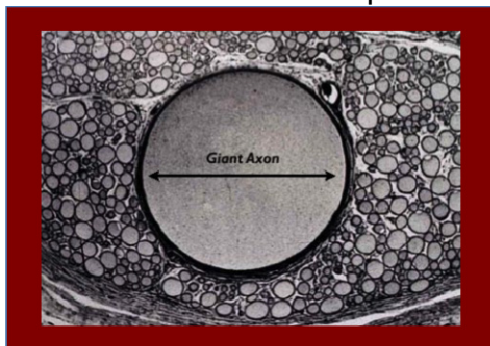


Ilustración 4. Axón gigante de calamar, una novedosa preparación para el estudio de la conducción nerviosa. Con permiso de Roger Hanlon.

directamente con la velocidad de conducción, presentando una velocidad de conducción más rápida aquellas fibras de diámetro mayor. Este hecho permitió comprender la velocidad a la cual la información es transmitida en el sistema nervioso.

Mientras en Alemania Adolfo Hitler tomaba plenos poderes del país, en Inglaterra un joven zoólogo de nombre John Zachary Young (1907-1997) encontró que el sistema nervioso de calamar contenía una notable estructura, un axón gigante de diámetro cincuenta veces mayor que

la fibra nerviosa más grande de mamífero. El tamaño gigante del axón de calamar facilitaba la manipulación y se convirtió en una preparación clave para el estudio de las bases iónicas de la conducción nerviosa. Con esta nueva preparación de axón gigante, Howard Curtis y Kenneth Cole (1900-1984), demostraron que el potencial de acción está asociado con un gran incremento en la conductancia de membrana. En el mismo año, Alan Hodgkin (1914-1998) y Andrew Huxley (1917-), investigadores británicos, realizaron el

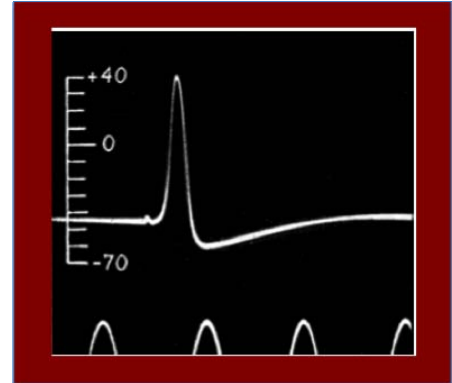


Ilustración 5. Potencial de Acción, un cambio transitorio del potencial de membrana. Tomado de Häuser, 2000.

primer registro intracelular de un potencial de acción, observando que éste comenzaba desde el potencial de reposo, alrededor de -45 mV, pasaba por los 0 mV, llegaba hasta aproximadamente +40 mV y finalmente disminuía con un pequeño exceso hasta el potencial de reposo, todo lo anterior ocurría en un tiempo aproximado de 1 milisegundo. Posteriormente Alan Hodgkin y Bernard Katz (1911-2003), explican que la inversión transitoria durante el potencial de acción, era debida a un incremento en la permeabilidad del ión sodio. Más tarde, Hodgkin, Huxley y Katz desarrollaron un circuito de fijación de voltaje para disponer de mediciones cuantitativas de corrientes iónicas a partir del axón de calamar. En estudios posteriores Hodgkin y Huxley muestran que la despolarización de membrana provoca una corriente entrante seguida de una corriente saliente y al realizar experimentos de sustitución iónica demuestran que la corriente iónica total podía ser separada en dos componentes diferentes: (i) una corriente entrante rápida acarreada por iones sodio y (ii) una corriente saliente más lenta acarreada por iones potasio, posteriormente con protocolos de fijación de voltaje de ingenioso diseño,

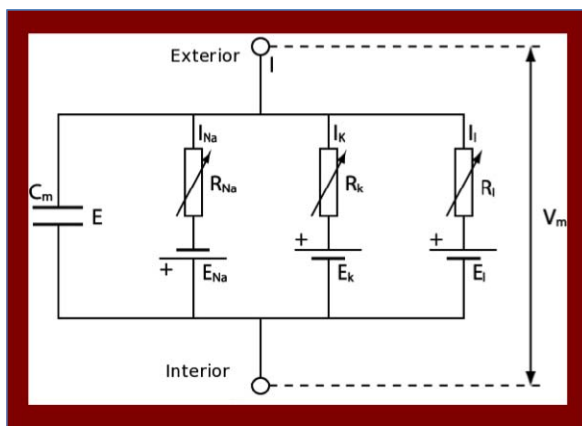


Ilustración 6. Modelo H-H donde se representan las corrientes de sodio (I_{Na}), de potasio (I_K) y de fuga (I_L). Modificado de Hodgkin y Huxley 1952 (pp. 500-544).

concluyeron que éstas dos corrientes eran debidas a mecanismos de permeabilidad independientes para el sodio y el potasio, con

cambios en la conductancia como una función del tiempo y del potencial de membrana. Además de sus experimentos de fijación de voltaje, Hodgkin y Huxley desarrollaron un modelo cuantitativo denominado modelo H-H, el cual consiste en la representación empírica de los datos experimentales obtenidos a partir de los registros en el axón gigante de calamar. El modelo H-H involucra la presencia de conductancias (todavía no sabían que eran canales iónicos) que pueden abrirse o cerrarse, estados que fueron determinados con ayuda de predicciones probabilísticas. Ellos representaron la corriente iónica total como la suma de las corrientes de sodio, potasio y una corriente denominada *de fuga*. Dicho modelo permitió establecer una relación entre las conductancias, las corrientes macroscópicas y el potencial de acción (Revisado en Hausser, 2000).

Años más tarde se demostró que los iones sodio no eran los únicos que podían generar potenciales de acción, ya que en la fibra muscular del crustáceo *Astacus fluviatilis* se detectaron potenciales de acción en ausencia de sodio, el cual fue sustituido por los iones divalentes calcio, estroncio y bario (Fatt & Ginsborg, 1958), estos resultados implicaron la presencia de poros selectivos para iones calcio. Así, las investigaciones siguientes

versaron sobre la participación del calcio en procesos como el acople excitación-contracción del músculo esquelético de rana (Edwards *et al.*, 1966), en el potencial de acción de la neurona gigante del molusco marino *Aplysia californica* (Geduldig & Junge, 1968), además de su papel en

la transmisión neuromuscular por acumulación y liberación de acetilcolina en preparaciones neuromusculares de rana (Katz & Miledi, 1967), con sus experimentos, Katz y Miledi descubrieron que el potencial de membrana de la placa motora

comienza a presentar ruido eléctrico en presencia de acetilcolina y ellos interpretaron esto como una serie de “sucesos elementales” producidos por la apertura y cierre de poros individuales debido a la unión o disociación entre estos y la acetilcolina.

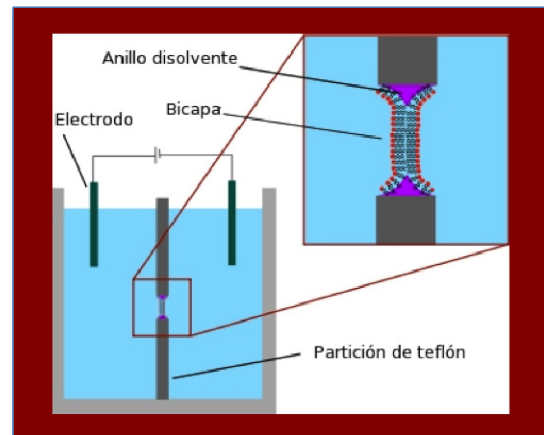


Ilustración 7. Formación de membranas artificiales. La bicapa de lípidos se forma en la pequeña apertura de la placa de material hidrofóbico (teflón) que separa los dos compartimentos. Las propiedades eléctricas de la bicapa son medidas por el uso de un electrodo. Modificado de Winterhalter M. 2000.

En la década de 1960 se desarrollaron varios métodos de formación de membranas artificiales compuestas por una doble capa de lípidos, semejantes a las membranas celulares (Mueller *et al.*, 1962; Tien, 1968), estas bicapas lipídicas eran buenos aislantes eléctricos, sin embargo cuando eran tratadas con algunos antibióticos o proteínas adquirían propiedades de un conductor eléctrico. Los resultados más interesantes sobre el estudio de las membranas artificiales mostraron que algunos de los antibióticos empleados inducían discretos y escalonados cambios en la conductancia cuando se adicionaban en cantidades muy pequeñas (Bean *et al.*, 1969; Hladky, 1970). Toda la evidencia hasta ese momento sugería que los cambios de conductancia observados representaban la inserción de estructuras sencillas que contenían un poro acuoso que permitía el flujo de cationes a través de él.

Desafortunadamente en aquel tiempo no era posible realizar mediciones similares en membranas biológicas, debido a que los métodos disponibles para registrar corrientes iónicas en células vivas normalmente estaban acompañados de niveles elevados de ruido eléctrico, este ruido era cien veces mayor que la señal del canal unitario observado en las membranas artificiales. La solución a este problema llegó en 1976 con el desarrollo de la técnica de *patch clamp* por Erwin Neher y Bert Sakmann (Neher, 1976). Ellos usaron micropipetas de vidrio cuya punta se pulía al calor procurando obtener un diámetro de apertura de aproximadamente 3-5 μm , esto con el fin de poder depositar la punta de la micropipeta sobre la superficie de la membrana celular y aislar un pequeño parche de membrana. El voltaje a través de este parche fue mantenido constante (“fijado”) por el uso de un amplificador operacional con retroalimentación.

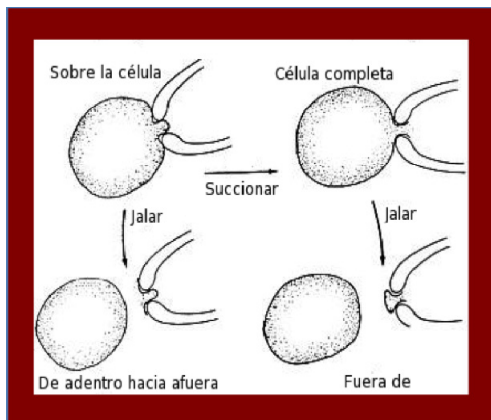


Ilustración 8. Modalidades de la técnica de *patch clamp*. Modificado de Hamill *et al.*, 1981.

Con esta innovación tecnológica, fue posible medir el flujo de corriente a través de los canales iónicos individuales presentes en el parche de membrana y entender mejor su funcionamiento básico (“*gating*”).

La técnica de *patch clamp* revolucionó por completo el estudio de las corrientes iónicas y comenzó a ser cada vez más productiva, especialmente después de algunas mejoras como lo fue la aplicación de una presión negativa dentro de la

micropipeta de registro y la consecuente formación de un sello de alta resistencia (Giga-sello) entre la punta de la micropipeta y la membrana celular (Hamill *et al.*, 1981).

Dentro de los trabajos que usaron la técnica de *patch clamp* para el estudio de canales unitarios, se encuentran los realizados por Susumu Hagiwara, quien trabajó con las corrientes de canales de calcio presentes en células de la hipófisis de rata, con sus experimentos Hagiwara reportó que el *gating* del canal de calcio ocurre por lo menos en dos distintos procesos, (i) El canal alcanza un estado activado a través de una cinética lenta y (ii) durante el estado activado el canal fluctúa entre los estados abierto y cerrado con una cinética de transición rápida, la cual es independiente de la cinética lenta descrita en el proceso (i) (Hagiwara, 1983). Hagiwara también demostró que los agentes químicos que secuestran al ión calcio favorecen la excitabilidad celular, debido a que previenen la inactivación dependiente de calcio. Asimismo, encontró que los iones divalentes bario, estroncio y calcio compiten por entrar al poro del canal, y que los iones metálicos de transición tales como níquel, cadmio y cobalto bloquean el flujo del ion calcio. Finalmente, Hagiwara reportó la presencia de canales de calcio en músculo de artrópodos, moluscos, neuronas, huevos fertilizados, hibridomas y líneas celulares derivadas de mieloma (Hagiwara & Kidokoro, 1971; Hagiwara *et al.*, 1978; Fukushima & Hagiwara, 1983; Fukushima, 1984; Corvalan, 1990).

Algunos años antes se habían iniciado las investigaciones acerca del estudio de la arquitectura de los canales iónicos, particularmente de los canales de potasio. Estos trabajos pioneros fueron realizados por Clay Armstrong quien describió la interacción de iones derivados del tetraetilamonio (TEA) en canales de potasio del axón gigante (Armstrong, 1971). En este trabajo Armstrong logró determinar que (i) los iones de amonio cuaternario entran a los canales de potasio sólo cuando la compuerta de activación del canal está abierta; (ii) la compuerta de activación del canal que es ocluida por el amonio cuaternario no se cierra fácilmente; (iii) la hiperpolarización facilita la salida de iones de amonio cuaternario del canal, y (iv) el aumento de

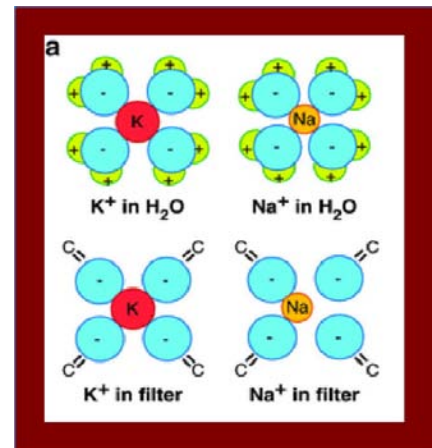


Ilustración 9. Esquema de hidratación de los iones sodio y potasio así como su interacción con los grupos carbonilos del filtro del canal. Armstrong, 2007.

la concentración externa de potasio también facilita la salida de los iones de amonio cuaternario del canal. Las dos últimas observaciones sugirieron fuertemente que los iones potasio cruzan la membrana celular por medio de poros, y que dichos poros están compuestos por dos distintas partes: (1) un amplio vestíbulo interno que puede aceptar un ión potasio hidratado o un ión de amonio cuaternario y (2), una porción estrecha que puede aceptar un ión de potasio deshidratado o parcialmente deshidratado, pero no el ión de amonio cuaternario.

Clay Armstrong junto con Francisco Bezanilla comenzaron a estudiar el fenómeno de la selectividad y conducción de los canales iónicos. Ellos propusieron una teoría para la selectividad de los canales al potasio, en la cual, en primera instancia, relacionan las interacciones electrostáticas entre el ión potasio o sodio y el oxígeno de la molécula de agua, proceso conocido como solvatación y que ocurre indistintamente del ión; después cuando el ión potasio se deshidrata para cruzar a través del canal, particularmente por un filtro delineado por grupos carbonilos cuyo arreglo se ajusta adecuadamente al diámetro del ión potasio, las interacciones ocurren ahora entre el oxígeno del grupo carbonilo y el ión potasio y estas son energéticamente semejantes a las que ocurren durante la solvatación. Para el ión sodio, sin embargo, la unión en el filtro no es favorable por que las paredes del filtro son fijas y rígidas, por lo tanto es imposible la interacción de los oxígenos del carbonilo con el ión sodio, el cual posee un radio iónico menor que el de potasio (Armstrong, 2007). Estos hallazgos junto con estudios posteriores mostraron un acercamiento cada vez más mayor hacia la estructura y funcionamiento de los canales iónicos.

Años más tarde investigadores ucranianos reportaron la presencia de dos tipos de canales de calcio en la membrana de neuronas del ganglio dorsal de rata (Veselovskii, 1983), este fue el primer reporte científico acerca de dos diferentes canales de calcio activados por voltaje. Desafortunadamente por cuestiones del sistema político imperante en la entonces Unión Soviética estos resultados no se publicaron en el mundo occidental, y un año después investigadores en Alemania reportaron dos diferentes corrientes iónicas de calcio presentes en neuronas sensoriales de pollo (Carbone & Lux, 1984), las cuales mostraban características prácticamente idénticas a las reportadas por los ucranianos un año antes.

En 1983 el grupo de Shosaku Numa comenzó a clonar los genes que codifican para las

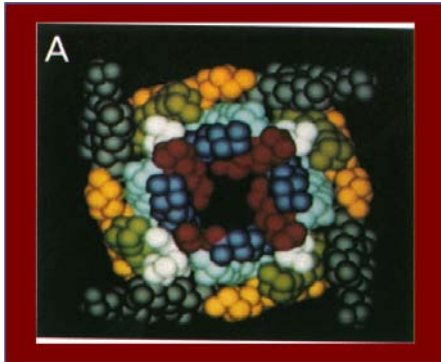


Ilustración 10. Modelos tridimensionales del receptor de acetilcolina. Guy *et al.*, 1986.

subunidades α , β , γ y δ del receptor de acetilcolina a partir del órgano eléctrico del pez torpedo (Noda *et al.*, 1983a; Noda *et al.*, 1983b), siendo precisamente este receptor el primer canal iónico en ser clonado y poner en claro su naturaleza proteica. Poco tiempo después fueron desarrollados modelos de estructura secundaria y terciaria de los segmentos transmembrana del canal de sodio a partir de la estructura primaria descrita por Noda y col. (1984). La secuencia de aminoácidos fue analizada con un método que predijo cuales de las porciones α -

hélice o estructuras β se encontraban expuestas a un medio acuoso, dentro de la proteína o expuestas a lípidos (Guy & Seetharamulu, 1986). Posteriormente investigaciones acerca del bloqueo de un canal de potasio por caribdotoxina (Miller *et al.*, 1985), junto con mutaciones en una región delimitada de canal (Yellen *et al.*, 1991) permitieron identificar la región del poro de los canales de potasio.

Finalmente, el sueño hecho realidad para todos los biofísicos se logró en 1998, cuando el grupo de Roderick MacKinnon después de un arduo trabajo de cristalización y análisis de rayos-X de la proteína del canal de potasio de *Streptomyces lividans*, mostraron por primera vez la estructura cristalina de alta resolución de un canal iónico (Doyle *et al.*, 1998), ellos capturaron la imagen tridimensional del canal de potasio, la cual sólo podía suponerse hasta ese momento. La estructura revelaba un poro en forma de cono compuesto por cuatro unidades, en la que sorprendente la forma de la proteína correspondía con su función.



Ilustración 11. Estructura del canal de potasio KcsA, basada en 1K4C (Zhou *et al.*, 2001). Resolución: 2Å.

Por otra parte, el grupo de Noda nuevamente logró la clonación de uno de los dos tipos de canales de calcio, los denominados canales de calcio de alto umbral de activación (HVA), y que resultaron ser el receptor de dihidropiridinas (Tanabe *et al.*, 1987). Esta vez su preparación enriquecida fue el músculo esquelético de conejo.

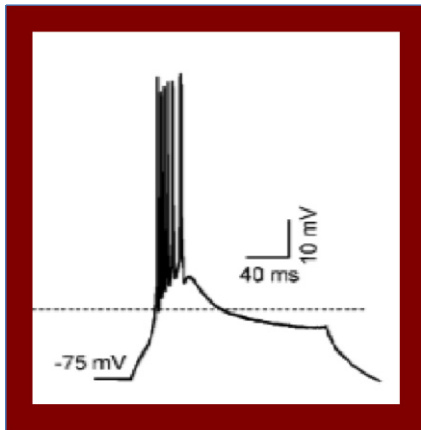


Ilustración 12. Potenciales de acción con un patrón de disparo de alta frecuencia. La actividad de los canales de Ca_v3 provoca los disparos en ráfaga. Tomado de Perez-Reyes, 2003.

Más tarde, el progreso en la secuenciación de los genomas de humano, de *S. cerevisiae* y del gusano *C. elegans* proporcionaron bibliotecas genómicas, la cuales pueden ser analizadas por computadora (*in silico*) permitiendo identificar secuencias conservadas en los genes entre especies. Esta herramienta fue utilizada por el grupo de Edward Perez-Reyes (Universidad de Virginia, EUA) como una herramienta para la clonación del segundo tipo de canales de calcio, los de bajo umbral de activación o LVA. El primer canal iónico en ser clonado con esta nueva herramienta bioinformática fue *CACNA1G*, el cual codifica para la subunidad $\alpha1G$ o

$Ca_v3.1$. El segundo gen fue *CACNA1H*, que codifica para $\alpha1H$ o $Ca_v3.2$ (Cribbs *et al.*, 1998; Perez-Reyes *et al.*, 1998). El gen *CACNA1I*, que codifica para $\alpha1I$ o $Ca_v3.3$ fue secuenciado como parte del Proyecto del Genoma Humano (Dunham *et al.*, 1999) y depositado en el GenBank posteriormente fue clonado y expresado (Lee *et al.*, 1999a; Gomora *et al.*, 2002).

Hace ya más de 50 años que Hodgkin y Huxley establecieron las bases de nuestro actual entendimiento acerca de los canales iónicos, este hecho fue el preámbulo para un impresionante progreso posterior que culminó con la revelación de los detalles estructurales del canal de potasio. No obstante las funciones de muchos canales iónicos permanecen desconocidas, y su relación entre la estructura y la función es todavía un campo de investigación lejos de ser agotado. Los estudios biofísicos han comenzado a revelar el mecanismo fundamental responsable de la selectividad de un canal hacia un ión sobre otro, y tanto científicos como médicos están aprendiendo mucho acerca del papel de los canales iónicos en la fisiología normal a partir de mutaciones en los genes que codifican para estas proteínas (canalopatías). Los canales iónicos tienen funciones de enorme relevancia; generan todo el flujo de información y comunicación del sistema nervioso central y periférico, controlan el latido del corazón, la percepción del sonido y la vista, la memoria, etc. Recientemente se han involucrado a los canales iónicos con varios aspectos característicos del cáncer, en los que su intervención no se limita a las funciones

clásicas de estas proteínas, sino a nuevas e insospechadas funciones que participan en los procesos malignos de esta enfermedad. Por ello, y por las propiedades estructurales todavía por dilucidar que determinan el funcionamiento de los canales iónicos, el estudio de estas sorprendentes proteínas continuará captando nuestra atención en las décadas venideras.