



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

*Evidencias moleculares referentes a los sitios de
unión de la amilorida y el TTA-A2 en el canal Cav3.2.*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

LUIS ENRIQUE MONTIEL REYES



DIRECTOR DE TESIS:
DR. JUAN CARLOS GÓMORA MARTÍNEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.
2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Reconocimientos

Este Proyecto, se llevo a cabo en el laboratorio BL-203 del Departamento de Neuropatología Molecular, División de Neurociencias en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Juan Carlos Gómora Martínez. También, se reconoce la supervisión logística del Q.F.B. Osbaldo López Charcas y de la Dra. Zazil Herrera Carrillo; así como el apoyo de la Unidad de Biología Molecular de la UNAM, por los servicios de secuenciación y síntesis de oligonucleótidos.

Reconocimiento especial a los sinodales

Dr. Juan Carlos Gómora Martínez

Dr. Arturo Hernández Cruz

Dra. Patricia Cano Sánchez

Dr. Marcelino Arciniega Castro

Q.F.B. Osbaldo López Charcas

Para la realización del presente trabajo de tesis se contó con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, Proyecto 167790); y del Programa de Apoyo a la Investigación e innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA-UNAM, Proyecto IN207614).

Agradecimientos

Este proyecto, es el resultado de un gran esfuerzo; sin embargo, su culminación no hubiera llegado de no contar con la ayuda de familiares, amigos y otras personas. Aunque algunos de ellos ya no estén presentes en mi vida, se les recuerda por lo mucho o poco de su contribución.

Primero, se agradece de antemano al Dr. Juan Carlos Gómora Martínez, asesor principal de este proyecto; quien me brindó la oportunidad de realizar mi Tesis de Licenciatura en el laboratorio que está bajo su dirección.

A mi segundo asesor, el Q.F.B. Osbaldo López Charcas por enseñarme los conocimientos teóricos y prácticos necesarios para poder realizar este trabajo.

A la Dra. Zazil Herrera Carrillo, por todo el apoyo técnico que me brindó durante la realización de mis experimentos.

A mis padres y hermanos por su apoyo incondicional. Su esfuerzo, me permitió llegar a este punto de mi vida.

Por último, a Linda Trejo Rosas, Vanessa Salvador Rincón, Javier Pineda Pereznuñez y Jhonatan Andrade Torres por estar conmigo en los buenos y malos momentos.

CONTENIDO

RESUMEN	1
1 INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Comunicación celular.....	3
1.2 Excitabilidad Celular	3
1.3 Canales iónicos.....	4
1.4 Canales iónicos activados por voltaje	4
1.5 Canales de calcio activados por voltaje	5
1.6 Estados de transición de los canales iónicos	8
2 ANTECEDENTES.....	10
2.1 Amilorida como bloqueador de los canales de calcio tipo T.....	10
2.2 Búsqueda del sitio de unión de la amilorida en el canal $Ca_v3.2$	12
2.3 Modelo tridimensional del canal $Ca_v3.1$ y sitio de unión del antagonista TTA-A2.	12
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
4 OBJETIVOS.....	18
5 HIPÓTESIS.....	19
6 MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
6.1 Construcción de canales mutantes del canal $Ca_v3.2$	20
6.2 Cultivo y transfección de células HEK-293 con los canales Ca_v3	22
6.3 Sembrado de células para registro electrofisiológico	23
6.4 Experimentos electrofisiológicos	23
6.4.1 Soluciones de registro.....	23
6.4.2 Electroodos de registro.....	24
6.4.3 Registro de corrientes de calcio con la técnica de <i>patch-clamp</i>	25
6.4.4 Protocolos de voltaje.....	26
6.5 Análisis de datos	27
7 RESULTADOS	28
7.1 Construcción de los canales mutantes.....	28
7.2 Efecto de la amilorida sobre los canales mutantes de $Ca_v3.2$ que se generaron con base al modelo del canal de KcsA.....	32
7.3 Efecto de la amilorida en el aminoácido Q1805 del canal $Ca_v3.1$	35
7.4 Bloqueo de los canales mutantes Q1848G y Q1848R por TTA-A2: conservación del sitio de unión a TTAs en el canal $Ca_v3.2$	37

7.5	Efecto de la amilorida sobre los canales $Ca_v3.2$ mutantes de Q1848.....	40
8	DISCUSIÓN	42
8.1	El sitio de unión a la amilorida no incluye ninguno de los aminoácidos sugeridos por el <i>docking</i> en el modelo del canal $Ca_v3.2$ generado con base al canal KcsA.....	42
8.2	Bloqueo de los canales mutantes de $Ca_v3.1$ por amilorida.	43
8.3	El sitio de unión a la amilorida y el TTA-A2 en los canales de $Ca_v3.2$ no comparten la glutamina 1848.....	45
9	CONCLUSIONES.....	47
10	REFERENCIAS.....	48

RESUMEN

El influjo de calcio a través de los canales de calcio activados por voltaje (canales Ca_v) es crucial para varias funciones celulares, incluyendo excitabilidad celular, contracción muscular, secreción de hormonas y neurotransmisores, diferenciación celular y expresión génica. La importancia de estos canales se ejemplifica también por el uso en la clínica de los llamados “bloqueadores de canales de calcio”, fármacos que se utilizan en el tratamiento de enfermedades como la hipertensión arterial. En la actualidad también se emplean en el tratamiento del dolor y algunos tipos de epilepsia. De manera adicional en los últimos años se han descrito varias enfermedades asociadas a mutaciones de los canales Ca_v , tal es el caso de la ataxia cerebelar y dolor de angina de pecho. Por tales razones, los canales Ca_v han sido objeto de una gran cantidad de estudios científicos a nivel básico y clínico, y en particular los canales de calcio tipo T o canales Ca_v3 , se han convertido en atractivos blancos terapéuticos para el tratamiento de desórdenes del sistema nervioso central y periférico.

Evidencias previas han demostrado que el fármaco amilorida inhibe la corriente de los canales de calcio tipo T de preparaciones nativas así como de canales recombinantes. A partir de experimentos con estos últimos se ha demostrado un bloqueo diferencial de los tres miembros de la subfamilia de canales Ca_v3 , siendo $Ca_v3.2$ el más sensible ($IC_{50} \sim 60 \mu M$), mientras que para los otros dos integrantes la afinidad disminuye en más de un orden de magnitud (más de $800 \mu M$ para $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.3$). Este bloqueo diferencial es el único reportado a la fecha para la subfamilia de los canales Ca_v3 , por lo que el objetivo principal del presente trabajo de tesis fue el de aportar evidencias acerca de las bases moleculares de este bloqueo selectivo del canal $Ca_v3.2$ por amilorida. Previamente, nuestro grupo de investigación ha obtenido información sobre algunos aminoácidos que podrían formar el sitio de unión a la amilorida en el canal $Ca_v3.2$, realizando experimentos de sobrelapamiento molecular (*docking*) de la amilorida en modelos tridimensionales de los canales Ca_v3 . La validez de dicha información fue puesta a prueba en este trabajo por experimentos de mutagénesis dirigida mediante la técnica de extensión del empalme por PCR (PCR SOEing) del canal $Ca_v3.2$ y de registros de la corriente de calcio empleando la técnica de *patch-clamp* en la configuración de célula completa.

El efecto bloqueador de la amilorida no se modificó de manera significativa por las mutaciones puntuales de varios aminoácidos sugeridos mediante los experimentos de *docking*, mismos que están localizados en una asa extracelular del Dominio I y en la parte extracelular del segmento S6 del Dominio IV.

Utilizando información adicional del sitio de unión al compuesto TTA-A2 en el canal $Ca_v3.1$, generada en nuestro laboratorio paralelamente al presente proyecto de investigación, se realizaron mutaciones puntuales de la glutamina 1848 (Q1848) del canal $Ca_v3.2$. Los resultados obtenidos con dichas mutantes en los experimentos de *patch-clamp* indican, por un lado, que el sitio de unión al TTA-A2 se conserva en el canal $Ca_v3.2$; y por otro lado, que dicho sitio de unión no comparte la Q1848 con el sitio de unión de la amilorida, ya que el bloqueo de las corrientes de calcio de dichas mutantes no fue diferente del observado en el canal $Ca_v3.2$ silvestre.

En conclusión, el sitio de alta afinidad del TTA-A2 que se ubica en la cavidad central de los canales Ca_v3 se conserva en los canales $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$, y considerando la similitud en las secuencias, podría estar conservado también en el canal $Ca_v3.3$. Por otro lado, los diferentes aminoácidos mutados en el presente trabajo no parecen formar parte del sitio de unión a la amilorida, ya que no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de bloqueo en estos con respecto al canal $Ca_v3.2$ silvestre. Por lo anterior, el sitio o sitios de unión a la amilorida deben estar ubicados en una región diferente a la cavidad central del canal, el cual parece estar relegado a antagonistas con IC_{50} s en el orden de las unidades de μM .

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Comunicación celular

La comunicación celular es un proceso de alta complejidad que requiere la participación de diferentes moléculas para generar una respuesta específica. Tales moléculas, lípidos, carbohidratos, proteínas e inclusive iones, tienen diferentes estructuras y funciones. Cada una de estas moléculas presenta propiedades fisicoquímicas específicas que les permiten permear la membrana celular, o requerir de un transportador específico para su ingreso al citoplasma o al núcleo [1]. En consecuencia, la célula necesita de diversos receptores que puedan interactuar con el tipo de moléculas antes mencionadas y así generar alguna respuesta en particular. En general se pueden clasificar tres tipos diferentes de receptores: 1) Acoplados a proteínas G; 2) Receptores asociados a enzimas con actividad catalítica; y 3) Receptores asociados a canales iónicos implicados en la transmisión de señales eléctricas [2]. El tema de la presente tesis se enfoca precisamente en un tipo de canales iónicos, los canales de calcio activados por voltaje, los cuales, entre otras funciones, también contribuyen a la excitabilidad celular.

1.2 Excitabilidad Celular

Las propiedades eléctricas de algunos tipos celulares de órganos y tejidos como las del corazón, músculo liso, glándulas secretoras y neuronas, son conferidas y moduladas por los canales iónicos. La excitabilidad celular se origina por el movimiento de iones a través de la membrana celular; estos iones principalmente son: sodio (Na^+), potasio (K^+), calcio (Ca^{2+}) y cloruro (Cl^-), [3]. Los primeros indicios acerca de las bases iónicas de la excitabilidad celular fueron obtenidos de una serie de estudios fundamentales realizados por Hodgkin y Huxley en el axón gigante del calamar [4-8]. A partir de estos trabajos pioneros, se describen los cambios en el potencial de membrana como una consecuencia de cambios en la permeabilidad de la membrana al Na^+ y al K^+ , sin embargo, fue hasta la década de los 70s del siglo pasado cuando se conoció que dichos cambios en la permeabilidad membranal eran debidos al funcionamiento de canales iónicos de naturaleza proteica presentes en la membrana plasmática a través de los cuales los iones pasan de un lado al otro de la membrana. El receptor a acetilcolina fue el primer canal del que se conoció su naturaleza proteica [9, 10] y subsecuentemente se conoció la de los canales de sodio [11] y de calcio [12] activados por voltaje.

1.3 Canales iónicos

Todas las células cuentan con canales iónicos o receptores asociados a canales iónicos. Los canales iónicos se encuentran no solo en la membrana plasmática, sino también en la membrana de otros organelos celulares como la mitocondria y el retículo sarcoplásmico, etc. La función canónica principal de los canales iónicos es permitir el movimiento de diferentes tipos de iones a través de las membranas biológicas, manteniendo la homeostasis de la célula. Todas las células, tanto de organismos unicelulares como multicelulares, incluyendo a las plantas y animales, utilizan estas proteínas para una amplia variedad de funciones [13].

A diferencia del transporte activo de iones a través de la membrana (el cual requiere de un gasto energético para llevarse a cabo), el transporte de iones que involucra a los canales iónicos no requiere de energía, ya que el flujo siempre está a favor del gradiente de concentración de la especie iónica en cuestión [1]. Cabe mencionar que la activación de dichos canales se debe a diferentes estímulos como pueden ser la unión de un ligando, cambios mecánicos por tensión o distensión de la membrana, cambios de pH, temperatura, o por cambios en el potencial de membrana (Fig. 1). Los canales que se activan por este último tipo de estímulo se denominan canales iónicos activados por voltaje [14].

1.4 Canales iónicos activados por voltaje

Los canales iónicos activados por voltaje (CIAV) forman una superfamilia de complejos proteicos transmembranales que comprende a los canales de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- , presentes en todas las células excitables. Esta familia de proteínas es responsable de generar los cambios de potencial eléctrico y despolarización de la membrana, dando como resultado, por ejemplo, un potencial de acción que se propaga para originar alguna respuesta fisiológica como la liberación de neurotransmisores por parte de las neuronas [3, 15]. No obstante, células consideradas no excitables, como es el caso de los espermatozoides, también expresan algunos tipos de canales iónicos activados por voltaje que son cruciales para funciones indispensables de la célula [16]. Incluso, más recientemente, la actividad de los CIAV también ha sido asociada a diferentes tipos de cáncer, sobre todo aquellos de origen epitelial [17, 18].

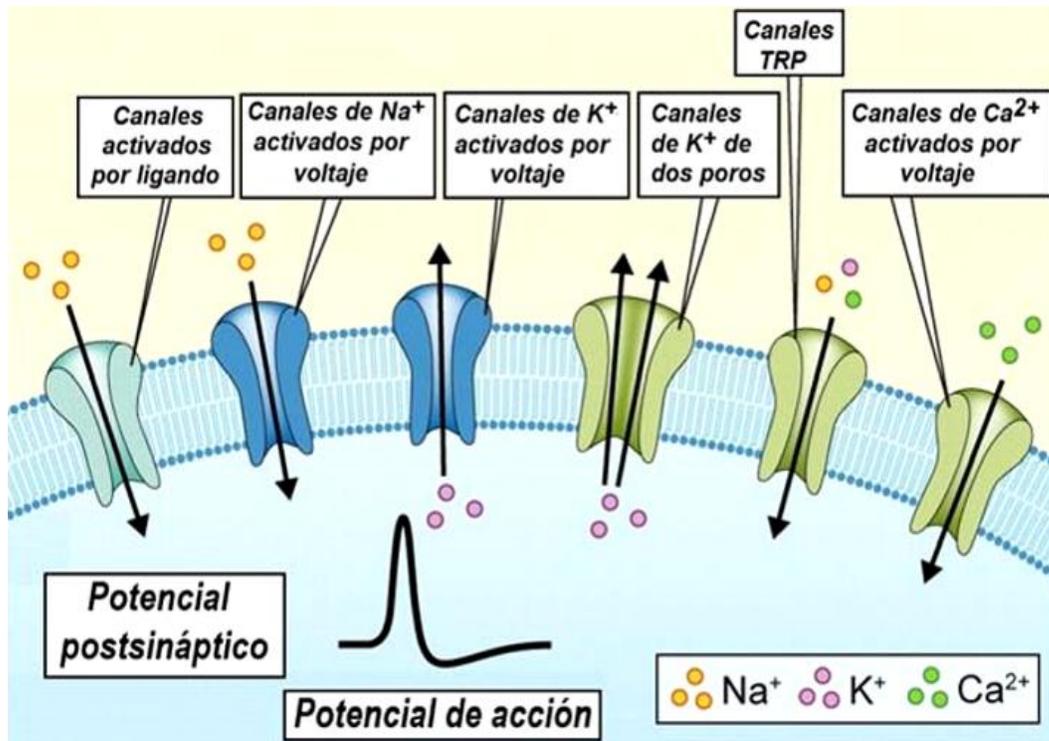


Figura 1. Diferentes tipos de canales iónicos. Se ilustran los tipos de canales iónicos involucrados en la excitación y propagación de señales eléctricas en una célula excitable. La generación de señales eléctricas (potenciales de acción y potenciales postsinápticos) pueden desencadenar cambios en el funcionamiento celular, como por ejemplo, el inicio de una cascada de señalización, la liberación de hormonas, o la contracción muscular. Modificada de [19].

1.5 Canales de calcio activados por voltaje

Los canales de calcio activados por voltaje (canales Ca_v) desempeñan dos funciones celulares fundamentales: por un lado contribuyen a la excitabilidad celular mediante el transporte de iones Ca^{2+} al interior de la célula, lo que provoca despolarizaciones del potencial de membrana (V_m) que pueden desencadenar potenciales de acción o solo fluctuaciones en el V_m que también son relevantes para la excitabilidad celular. La segunda función de los canales Ca_v consiste en acoplar precisamente la excitabilidad celular con el metabolismo celular [3], ya que el Ca^{2+} que entra a través de estos canales desempeña diferentes funciones celulares como la señalización celular, metabolismo, liberación de hormonas y neurotransmisores, contracción muscular, regulación génica, proliferación y migración celular [20-22].

La familia de los canales Ca_v se clasifican generalmente en dos grandes grupos, los canales de alto umbral de activación o HVA (por sus siglas en inglés) con un intervalo de voltajes de activación

entre -30 y -20 mV; este grupo de canales incluye los miembros de la subfamilia Ca_v1 y los de la subfamilia Ca_v2 (Tabla 1). El otro grupo de canales Ca_v lo constituyen los canales de bajo umbral de activación o LVA, los cuales se activan a valores de voltaje cercanos al V_m de varios tipos celulares (entre -50 y -40 mV). En este grupo solo se ubican los miembros de la subfamilia Ca_v3 ($Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$), y también se les conoce como canales de calcio tipo T [21, 23].

Los canales HVA y LVA también difieren en su composición molecular. Ambos grupos consisten de una subunidad principal llamada $\alpha1$ (Fig. 2A) formada por una proteína de aproximadamente 2000 aminoácidos. Esta subunidad contiene cuatro dominios homólogos (I a IV) unidos entre sí por asas intracelulares, y cada dominio, a su vez, está compuesto por seis segmentos transmembranales (S1 a S6), interconectados por asas intra y extracelulares [24]. Sin embargo, los canales HVA cuentan con diferentes subunidades accesorias o reguladoras de la actividad de estos canales (Fig. 2B) [25]. En contraste, a la fecha no se han reportado subunidades accesorias que regulen la actividad de los canales LVA (Fig. 2C), los cuales solo requieren de la subunidad $\alpha1$ para funcionar y generar corrientes similares a las corrientes de calcio tipo T nativas. No obstante, algunos trabajos han reportado que la actividad de los canales Ca_v3 puede ser modulada en menor grado por las subunidades accesorias de los canales HVA [26-29]. La subunidad β reside completamente en el citoplasma y es la que modula más estrechamente las propiedades biofísicas de los canales HVA (dependencia al voltaje y cinética de la activación e inactivación de la corriente) y actuando como chaperona, regula el tráfico de la subunidad $\alpha1$ a la membrana plasmática. Actualmente se conocen cuatro isoformas de estas subunidades: $\beta1$, $\beta2$, $\beta3$ y $\beta4$ [25]. Otra de las subunidades que acompañan a los canales HVA es la conocida como $\alpha2\delta$, descrita por Klugbauer y colaboradores [30]. Actualmente, se han reportado cuatro subunidades conocidas como $\alpha2\delta-1$, $\alpha2\delta-2$, $\alpha2\delta-3$ y $\alpha2\delta-4$ [31]. Es una proteína con una región extracelular, compuesta por la $\alpha2$, que se une con la subunidad δ mediante la formación de enlaces disulfuro. La información más reciente indica que la subunidad δ está anclada a la membrana a través de un motivo glicosil-fosfatil inositol (GPI), sin atravesar la membrana en su totalidad (Fig. 2B) [32, 33]. La subunidad $\alpha2\delta$ tienen una participación discreta en términos funcionales sobre la apertura y expresión del canal [34]; en algunos trabajos se ha propuesto a

esta subunidad como posible receptor para fármacos antiepilépticos y analgésicos [34, 35]. Por último, la subunidad γ consiste de cuatro segmentos transmembranales y se han descrito ocho isorformas ($\gamma 1$ a $\gamma 8$). También modifica algunas propiedades biofísicas, en particular la dependencia al voltaje; sin embargo, parece no afectar el número de canales que llegan a la membrana [36-39].

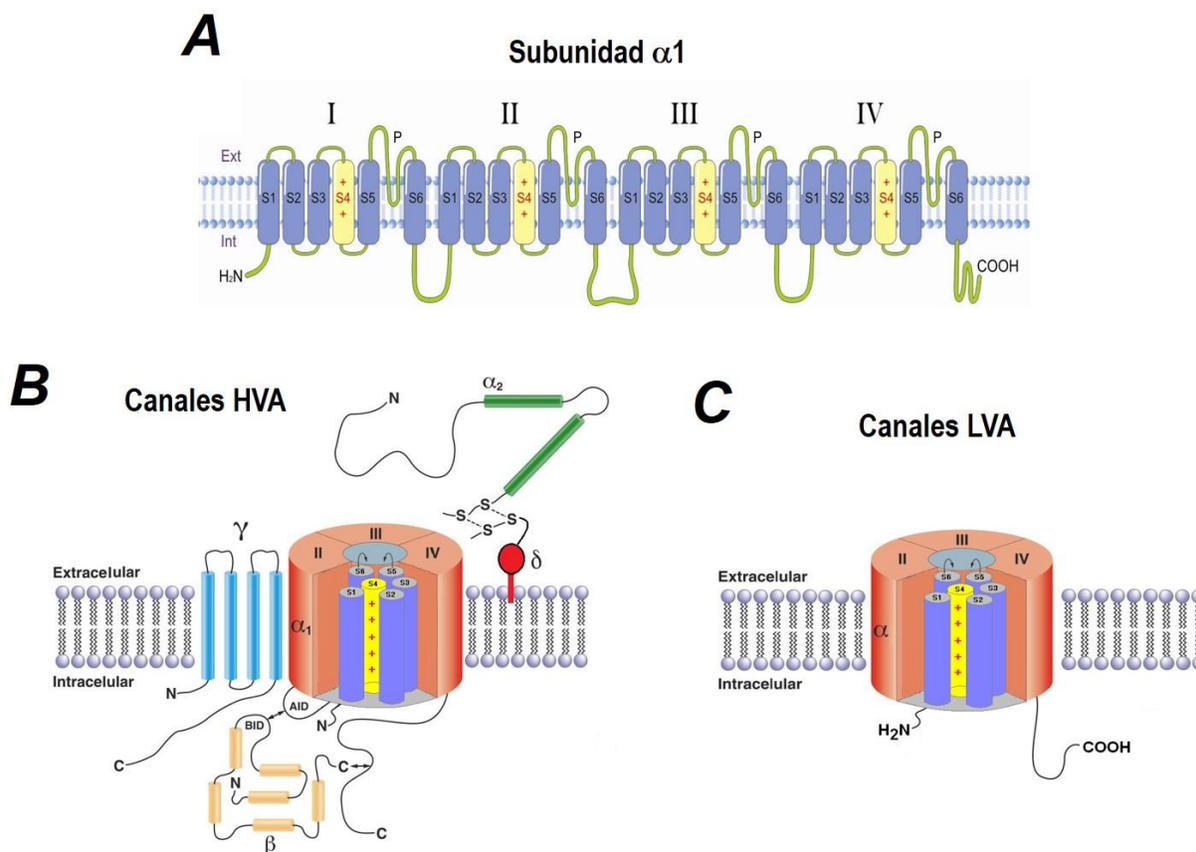


Figura 2. Estructura de los canales de Ca_v . **A**, Esquema topológico de la subunidad $\alpha 1$ común a todos los canales Ca_v . Es una proteína transmembranal (~270 kDa) constituida por cuatro repetidos homólogos (I a IV), cada uno de los cuales se compone de seis regiones transmembranales (S1 a S6) y una asa de poro (P). El segmento S4 presenta aminoácidos con carga positiva cada 3 posiciones, característica que le permite detectar cambios en el V_m , por lo que se le conoce como sensor de voltaje. **B**, **C**, Representación esquemática de la composición y ensamble molecular de los canales HVA y LVA, respectivamente. El arreglo tridimensional de la subunidad principal $\alpha 1$ en la membrana plasmática forma el poro conductor de iones al centro de la proteína. Obsérvese que en el arreglo de los cuatro dominios de la subunidad $\alpha 1$, uno de ellos (Dominio I) se ha representado los 6 segmentos transmembranales (S1-S6) como cilindros, y el sensor de voltaje (S4) en color amarillo. En los canales HVA la subunidad $\alpha 1$ se encuentra asociada con las subunidades accesorias $\alpha 2\delta$ (en color verde), β (en color melón), y γ (en azul); mientras que los canales LVA están conformados únicamente por la subunidad $\alpha 1$. La subunidad β es completamente intracelular y se asocia con la subunidad $\alpha 1$ por medio de la interacción entre el BID (dominio de interacción de la subunidad beta) y el AID (dominio de interacción de la subunidad alfa). Modificada de [40].

Además del voltaje de activación, las características generales que definen a los canales HVA es que presentan una inactivación lenta, un cierre del canal muy rápido y una conductancia unitaria (medición de la permeabilidad de los iones a través de la membrana) de 24 pico Siemens (pS). Por el contrario, en los canales LVA dichas características son inactivación rápida (corriente transitoria), cinética de cierre del canal de 5-10 veces más lenta, y conductancia unitaria 3 veces más pequeña (8 pS) [41].

Otra clasificación un poco más detallada, está basada en el tipo de corriente que generan cada uno de estos canales (Tabla 1). Por ejemplo, los canales Ca_v1 generan corrientes tipo L que son de larga duración y los canales Ca_v3 generan corrientes transitorias tipo T. En algunos trabajos, se reportaron corrientes que no coincidían con las tipo L, ni con las tipo T, por lo que se les denominó corrientes tipo N [42]. También, se describieron corrientes tipo P/Q en neuronas de Purkinje y en neuronas granulares de cerebelo. Se denominan corrientes tipo P/Q, debido a que estos canales son codificados por el mismo gen; sin embargo su diferencia está dada por una variante de empalme generada por el procesamiento alternativo del mRNA [43, 44]. Por último, en células granulares de cerebelo, se encontró un tipo de corriente residual que permanecía después de haber bloqueado o prevenido las corrientes tipo L, N, P/Q y T, por lo que se le denominó corriente tipo R [43].

1.6 Estados de transición de los canales iónicos

El funcionamiento general de los canales iónicos, y en particular el de los canales de calcio activados por voltaje se esquematiza en la Fig. 3. En respuesta a un pulso despolarizante, los canales sufren un cambio conformacional que facilita la transición del estado cerrado del canal (en reposo, es decir al V_m de la mayoría de las neuronas y células excitables, alrededor de -70 mV) al estado abierto, en el cual ocurre el flujo de iones a través del poro de conducción del canal. Sin embargo, después de un tiempo variable en el estado abierto, el canal transita a un estado no conductor, caracterizado por una reducción de la amplitud de corriente, denominado estado inactivado, es decir el canal no se ha cerrado, pero no permite el flujo de corriente. Posteriormente, al repolarizar el V_m al potencial de reposo, los canales transitan al estado

cerrado (Recuperación) a partir del cual pueden ser activados nuevamente. Digno de destacar es que una vez en el estado abierto, los canales pueden transitar directamente al estado cerrado (Desactivación) sin pasar por el estado inactivado, siempre que la repolarización suceda lo suficientemente rápido de tal manera que el canal no se inactive. La transición de un estado a otro se conoce como *gating* del canal o “movimiento de las compuertas del canal” [45].

Tabla 1. Características que distinguen a los canales de calcio activados por voltaje.

Nombre del canal	Tipo de corriente	Localización	Antagonistas específicos	Función en la célula
Ca _v 1.1	L	Musculo esquelético, túbulos transversos	Dihidropiridinas Fenilalquilaminas Benzotiazepinas	Acople excitación-contracción
Ca _v 1.2	L	Miocitos cardiacos, 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 neuronales y dendritas; miocitos auriculares cardiacos y células marcapaso, célula coclear del cabello	Dihidropiridinas Fenilalquilaminas Benzotiazepinas	Liberación de hormonas, regulación de transcripción, regulación sináptica, marcapaso cardiaco, neurotransmisión en células sensoriales
Ca _v 1.4	L	Células bastón y bipolar de la retina, medula espinal, glándula adrenal, células cebadas	Dihidropiridinas Fenilalquilaminas Benzotiazepinas	Neurotransmisión en fotorreceptores
Ca _v 2.1	P/Q	Terminales nerviosas y dendritas; células neuroendocrinas	ω-Agatoxina IVA	Neurotransmisión, transitorios de Ca ²⁺ dendríticos, liberación de hormonas
Ca _v 2.2	N	Terminales nerviosas y dendritas; células neuroendocrinas	ω-Conotoxina GVIA	Neurotransmisión, transitorios 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, transitorios de Ca ²⁺ dendríticos
Ca _v 3.1	T	Cuerpos celulares neuronales y dendritas; miocitos del musculo liso y cardiaco	Mibefradil	Marcapaso, disparo en ráfaga del potenciales de acción
Ca _v 3.2	T	Cuerpos celulares neuronales y dendritas; miocitos del musculo liso y cardiaco; espermatozonias	Mibefradil	Marcapaso, disparo en ráfaga del potenciales de acción
Ca _v 3.3	T	Cuerpos celulares neuronales y dendritas	Mibefradil	Marcapaso, disparo en ráfaga del potenciales de acción

Modificada de [46].

Es importante mencionar que la representación gráfica de la Fig. 3 es bastante simplista, pues las transiciones de un estado a otro no son necesariamente en la secuencia que se muestra en la misma. Por ejemplo, los canales $Ca_v3.1$ (canal tipo T) pueden transitar del estado cerrado al estado inactivado sin pasar por el estado abierto [47]. Sin embargo, para los fines del presente manuscrito solo se esquematizan los estados y transiciones más generales (Fig. 3).

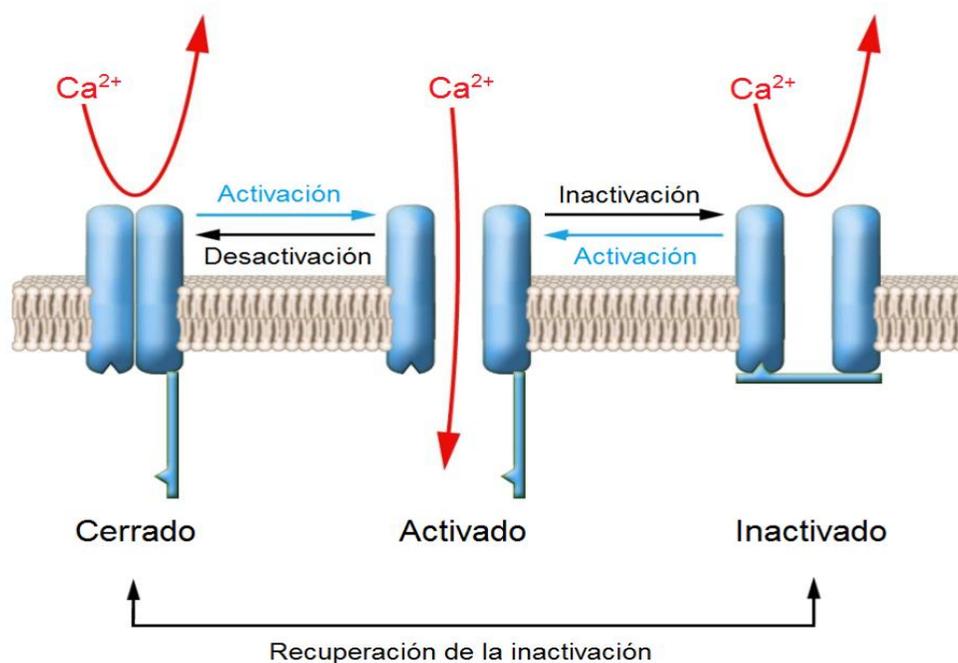


Figura 3. Estados conformacionales principales por los que transitan los canales Ca_v3 . La activación del canal sucede por la transición del estado cerrado (en reposo) al abierto que permite el paso de iones a través del poro de la proteína del canal. La inactivación se caracteriza por ser un estado no conductor, no obstante que el canal no se ha cerrado, es decir, el estado inactivado es un estado abierto no conductor. Y por último, la desactivación del canal, que refleja la transición del estado abierto al cerrado, sin pasar por el estado inactivado. Modificada de [48].

2 ANTECEDENTES

2.1 Amilorida como bloqueador de los canales de calcio tipo T

La amilorida (3,5-diamino-6-cloro-N-(diaminometilideno)pirazina-2-carboxamida) es un fármaco utilizado como diurético de tipo ahorrador de potasio para tratar la hipertensión arterial. Su efecto es mediado a través de su interacción de alta afinidad con el canal de sodio epitelial (ENaC) presente en el riñón, su blanco molecular primario [49]. Fue sintetizado por laboratorios Merck Sharp & Dohme's en 1965 [50] y aprobado dos años después para usarse en la clínica (Fig. 4A).

La IC_{50} (concentración requerida para bloquear el 50% de la corriente de los canales de Na^+) reportada para este compuesto varía de acuerdo a las condiciones experimentales que se utilicen, desde 0.1 hasta 1 μM [51]. La amilorida es una base débil con pH fisiológico y su forma catiónica es la única biológicamente activa. Esto permite inferir que amilorida bloquea el canal por la interacción con el sitio de unión a Na^+ [52]. Posteriormente, varios trabajos reportaron que la amilorida también interacciona con los canales de calcio tipo T, bloqueando las corrientes nativas de estos en diferentes preparaciones experimentales [53, 54]. Recientemente se ha demostrado el bloqueo de las corrientes de calcio en canales tipo T recombinantes, confirmando un bloqueo diferencial de esta subfamilia de canales Ca_v por el diurético [55]. Existe cierta controversia en considerarlo como un bloqueador selectivo de los canales Ca_v3 , debido a que la IC_{50} se encuentra en las decenas y hasta cientos de μM para los tres canales tipo T ($Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$). El canal más sensible de estos tres al bloqueo por amilorida, lo representa el canal $Ca_v3.2$ o $\alpha 1H$, ya que estudios recientes de nuestro grupo de trabajo han demostrado que la amilorida bloquea con una IC_{50} de aproximadamente 60 μM las corrientes de este canal (Fig. 4B). Además de que el diurético modifica las propiedades biofísicas de los canales de calcio tipo T de manera diferencial [55].

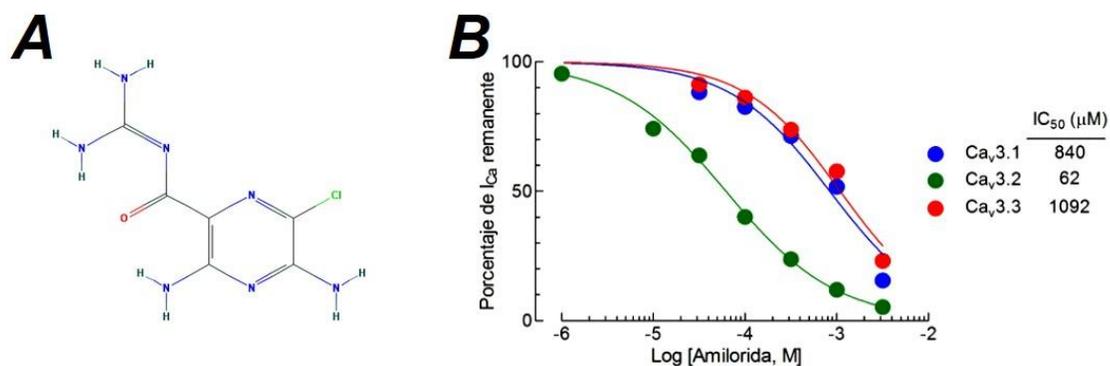


Figura 4. Estructura del diurético amilorida y curvas dosis respuesta del bloqueo de los canales Ca_v3 por amilorida. **A**, Estructura de la amilorida en imagen 2D [56]. **B**, Curvas dosis-respuesta del bloqueo de los canales Ca_v3 por el fármaco amilorida. Se observa claramente que se necesita una concentración 10 a 15 veces menor de amilorida para bloquear el 50% de los canales $Ca_v3.2$ con respecto a $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.3$. Adaptada de [55].

2.2 Búsqueda del sitio de unión de la amilorida en el canal $Ca_v3.2$

A partir de los resultados sobre el bloqueo diferencial que ejerce la amilorida en el canal $Ca_v3.2$ con respecto a los otros dos miembros de la subfamilia Ca_v3 [55], en el laboratorio del Dr. Gómora se inició la búsqueda del sitio o sitios de unión de la amilorida en la proteína del canal $Ca_v3.2$. Para ello se recurrió a una estrategia experimental que involucra física computacional. En otras palabras, el objetivo fue identificar el sitio de unión de la amilorida en el canal $Ca_v3.2$ mediante simulaciones de acoplamiento molecular (*docking*) en un modelo de la estructura tridimensional del canal $Ca_v3.2$.

Debido a que a la fecha no existe la estructura cristalográfica de los canales de calcio tipo T, inicialmente se utilizó como molde la estructura cristalográfica del canal de potasio KcsA activado por pH (Código de acceso en el *Protein Data Bank*: 1K4C) [57], para generar un modelo por homología de los tres canales Ca_v3 [55, 58]. Cabe mencionar que los modelos generados en ese momento solo incluían los segmentos S5 y S6 de los cuatro dominios de la subunidad α_1 del canal (Fig. 5). Estos modelos se utilizaron previamente para obtener algunas evidencias referentes al mecanismo de bloqueo de los canales Ca_v3 por el ácido niflúmico [59]. A partir de los análisis de las simulaciones de *docking* en los modelos tridimensionales de la Fig. 5, se obtuvo una lista de aminoácidos que podrían formar el sitio de unión de la amilorida en el canal $Ca_v3.2$, mismos que representan la primera serie de mutaciones a construir en el presente trabajo de tesis (Tabla 3). Como se puede observar en la Fig. 5B, las simulaciones de *docking* sugieren dos posibles sitios de unión de la amilorida en el canal $Ca_v3.2$, sin embargo, debido a que experimentos electrofisiológicos sugieren que el sitio 1 (círculo rojo en Fig. 5B) es más sensible al bloqueo por amilorida que el sitio 2 que se ubica más cerca de la cara intracelular del canal $Ca_v3.2$ [55], el presente trabajo se enfocó en los aminoácidos del sitio 1 para investigar su participación en la interacción con la amilorida.

2.3 Modelo tridimensional del canal $Ca_v3.1$ y sitio de unión del antagonista TTA-A2.

Paralelamente a la realización del presente trabajo de tesis, mi compañero de laboratorio Eduardo Chávez Colorado generó un nuevo y significativamente mejorado modelo tridimensional

del canal $\text{Ca}_v3.1$. En este caso, Eduardo realizó un extenso y profundo análisis de los diferentes tipos de canales iónicos cristalizados hasta ese entonces, principalmente de varios tipos de canales Na_v de células procariontas y decidió utilizar las estructuras del canal Na_v aislado de *Arcobacter butzleri* (PDB: 4MS2 y 3RVY) [60, 61]. Las razones para tal decisión fueron que los canales de sodio son más parecidos a los canales Ca_v3 (por secuencia proteica y características electrofisiológicas), el canal Na_v de *A. butzleri* contiene 24 segmentos transmembranales arreglados en cuatro Dominios como los canales Ca_v3 (Fig. 2A), solo se excluyeron las regiones intracelulares, que unen a cada uno de los cuatro dominios, así como los extremos amino y carboxilo de la proteína. Así, el modelo que se obtuvo es una mejor representación del canal completo y no solo del dominio del poro (como los modelos de la Fig. 5); además, el canal Na_v que se empleó como modelo es activado por voltaje como los Ca_v3 y no por pH como el KcsA.

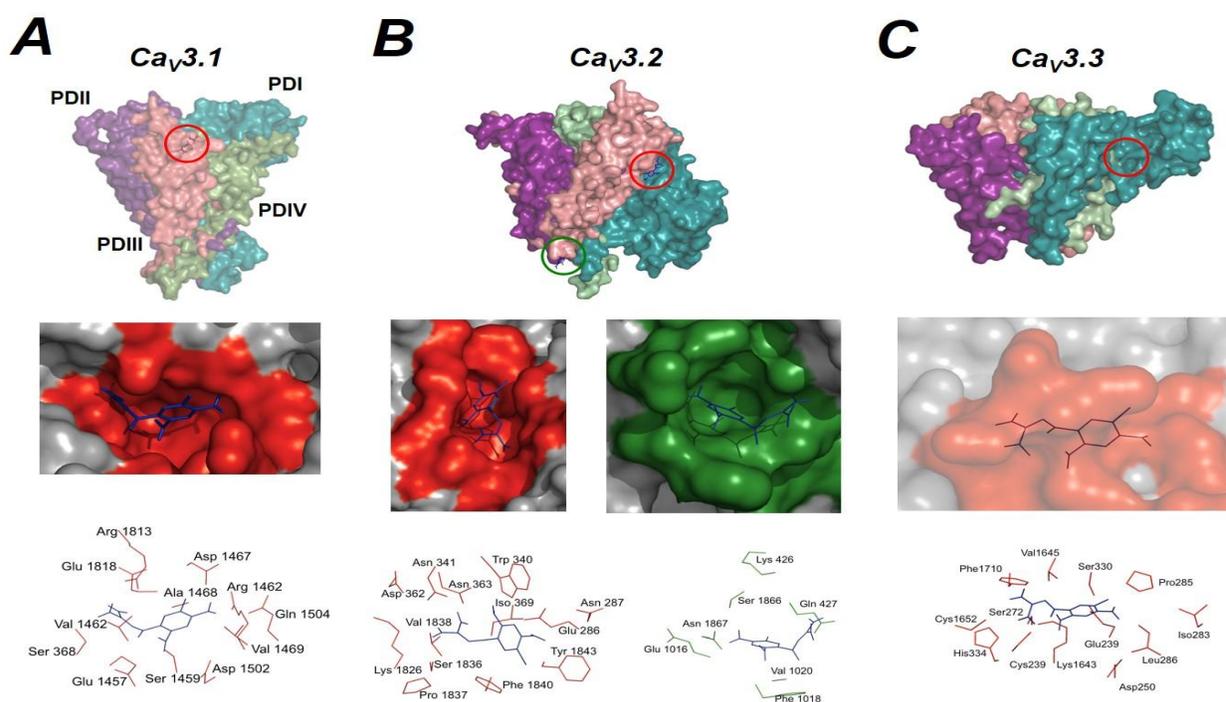


Figura 5. Modelos tridimensionales de los dominios del poro de los canales Ca_v3 y acoplamiento molecular de la amilorida. Modelos tridimensionales de los canales $\text{Ca}_v3.1$ (A), $\text{Ca}_v3.2$ (B) y $\text{Ca}_v3.3$ (C) obtenidos por homología con el canal KcsA (PDB 1K4C). En cada canal se indica con círculos los sitios probables de unión de la amilorida obtenidos mediante simulaciones de *docking*. Nótese que en el canal $\text{Ca}_v3.2$ se obtuvieron dos posibles sitios, uno ubicado hacia la región extracelular del canal y el segundo (círculo verde) más cercano a la región citoplasmática del canal. Los paneles centrales muestran un acercamiento de cada uno de los sitios de unión con la molécula de amilorida incluida. Los paneles inferiores ilustran los aminoácidos propuestos para formar cada uno de los sitios de unión (en líneas rojas) y el arreglo de la amilorida en cada uno de ellos (líneas azules). PD, indica el dominio del poro de cada uno de los cuatro Dominios de la subunidad α_1 . Modificada de [58].

El modelo obtenido por Eduardo fue utilizado para realizar simulaciones de *docking* con el compuesto TTA-A2 (Fig. 6), un antagonista de los canales de calcio tipo T (TTA: T-Type Antagonist), desarrollado, junto con otros compuestos como el TTA-P2 y TTA-Q4, en 2009 por los laboratorios de investigación de la compañía Merck (West Point, PA, EUA) [62]. La característica de estos TTAs es su considerable potencia para bloquear los canales tipo T, con IC_{50} s alrededor de $1 \mu M$, por lo que se les considera bloqueadores con alta afinidad por estos canales de calcio. Particularmente, el interés de Eduardo y nuestro grupo de investigación se concentró principalmente en el compuesto TTA-A2. En varios trabajos se ha reportado el bloqueo selectivo de los canales de calcio tipo T, cuya actividad se relacionó con la respuesta analgésica y desordenes psiquiátricos [63-65]; de ahí, la importancia de su estudio como antagonista de canales de calcio para posibles usos terapéuticos.

En resumen, las simulaciones de *docking* con el TTA-A2 y el modelo tridimensional del canal $Ca_v3.1$, proporcionaron información de la existencia de una región en la cavidad central del canal como posible sitio de unión del TTA-A2 (Fig. 6A). En particular, se encontró que un residuo de glutamina (posición 1805 de la proteína) que forma parte de la hélice alfa del segmento S6 del dominio IV, tiene un papel crucial en la unión del TTA-A2 a la proteína del canal $Ca_v3.1$ (Fig. 6B). La cadena lateral de la Q1805 se orienta hacia la luz de la cavidad central y parece interactuar energéticamente con el fármaco, de tal forma que si se substituye dicho aminoácido por otro (alanina, prolina, arginina, serina, o treonina), el bloqueo del TTA-A2 disminuye en 66% con respecto al que se observa en presencia de la Q1805 (Fig. 7) [66]. El acceso del TTA-A2 (y sus análogos como el TTA-P2) podrían estar accediendo a la cavidad central a través de la “fenestraciones” o aberturas laterales del modelo del canal $Ca_v3.1$ (Fig. 6B). Tales fenestraciones comunican la cavidad central con la bicapa lipídica de la membrana plasmática, su existencia se ha demostrado en los canales Na_v [67].

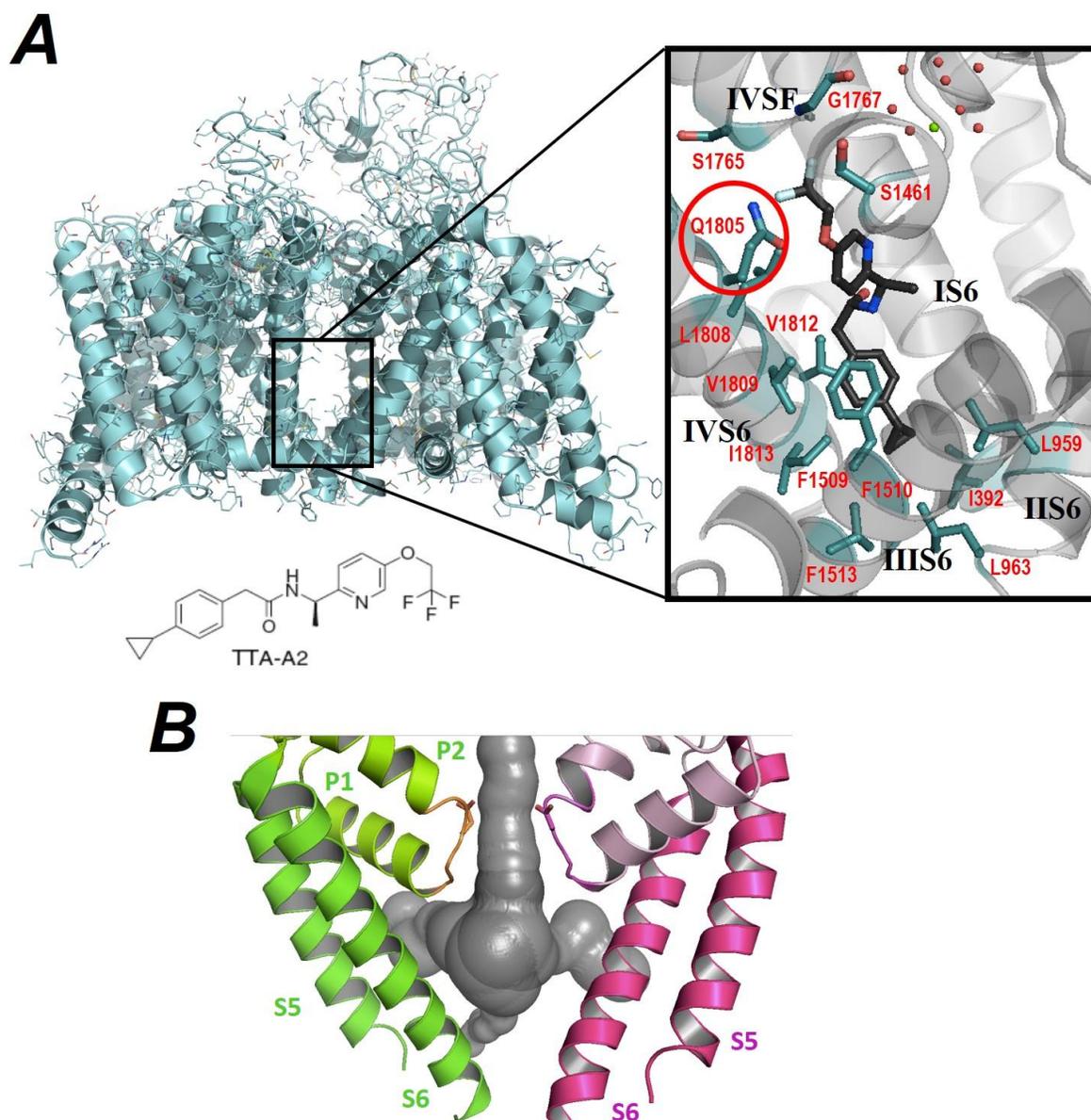


Figura 6. Modelo tridimensional del canal $Ca_v3.1$ generado por homología con el canal Na_v de *Arcobacter butzleri* y sitio de unión del TTA-A2. **A**, Modelo tridimensional de la estructura del canal $Ca_v3.1$. Se muestran las 24 hélices alfa de los segmentos transmembranales (en representación de listones) y las asas extracelulares (líneas curvas). En el recuadro se muestra un acercamiento de la cavidad central con la molécula del TTA-A2 (estructura en líneas gris oscuro marino) mostrando los aminoácidos con los que estaría interactuando para formar su sitio de unión. La ubicación de la glutamina 1805 es indicada con un círculo rojo. Al pie del modelo se presenta la estructura del TTA-A2. **B**, Esquema de la estructura del poro del canal $Ca_v3.1$ formado por los segmentos transmembranales S5 y S6 de cada dominio, aunque solo se muestran los del Dominio II (color magenta) y IV (color verde). El filtro de selectividad se origina por el asa que une dos hélices alfa (P1 y P2). La superficie gris representa la cavidad central y algunas rutas de acceso al poro. La ruta de acceso vertical es el poro de conducción, mientras que en la parte inferior no se observa una salida debido a que el modelo fue obtenido a partir de la estructura de un canal en el estado cerrado [67]. Las rutas de acceso horizontales (fenestraciones) permiten la entrada de moléculas hidrófobas (como podrían ser los TTAs) a través de la membrana. Modificada de [68].

Como se puede inferir, la lista de aminoácidos por los que se sustituyó la Q1805, abarca todo el espectro de propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos. Primeramente, se propuso alterar la interacción del TTA-A2 con su sitio de unión, por lo que se intercambié por una alanina (A); debido a que la cadena lateral de este residuo contiene solo un grupo metilo, su reactividad en términos energéticos es muy baja, y no altera la estructura de hélice alfa de los segmentos transmembranales. De hecho, el “scanning” o tamizaje de alaninas es la estrategia más usada para estudiar la contribución de un aminoácido a la función, estabilidad y forma de dicha región proteica [69-72]. Además, también se investigó el efecto de la sustitución por una prolina (P), para alterar (“romper”) la estructura terciaria de la hélice alfa y por lo tanto, afectar sustancialmente el sitio de unión al fármaco [73, 74]. En el caso del intercambio por una arginina (R), se hace con el propósito de que ésta funcione como una sonda, debido a su larga cadena lateral [72]; así se puede ubicar indirectamente las regiones de la proteína donde podría encontrarse un probable sitio de unión a un ligando. Finalmente, las sustituciones por serina (S) y treonina (T) permiten explorar el papel de residuos hidrofóbicos sin perturbaciones drásticas como las inducidas por la prolina.

El resumen de los resultados obtenidos al explorar el efecto del TTA-A2 en algunas de las mutantes construidas en base a las simulaciones de *docking* en el canal $Ca_v3.1$, se presenta en la Fig. 7. Se puede observar que el bloqueo de las mutantes Q1805A, Q1805P, y Q1805R inducido por el TTA-A2 fue solamente un tercio o menos, del observado en el canal $Ca_v3.1$ silvestre, es decir, cuando la Q1805 se mantuvo en su posición. Lo anterior sugiere que esta glutamina es parte fundamental en el sitio de unión del TTA-A2 en el canal $Ca_v3.1$. En este sentido, se realizó un alineamiento de las secuencias de los tres canales Ca_v3 para conocer si dicho residuo se conserva en los canales $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$. En la Fig. 7B se muestra el resultado de dicho alineamiento y confirma que la glutamina es conservada en los canales de calcio tipo T, pero, interesantemente, no en los canales HVA tipo L ($Ca_v1.2$). Estos resultados marcaron la pauta para determinar si el mismo sitio de unión de alta afinidad existe en el $Ca_v3.2$, así como para evaluar si el fármaco amilorida interactúa de alguna manera con la glutamina del S6 conservada en el canal $Ca_v3.2$ (Fig. 7B).

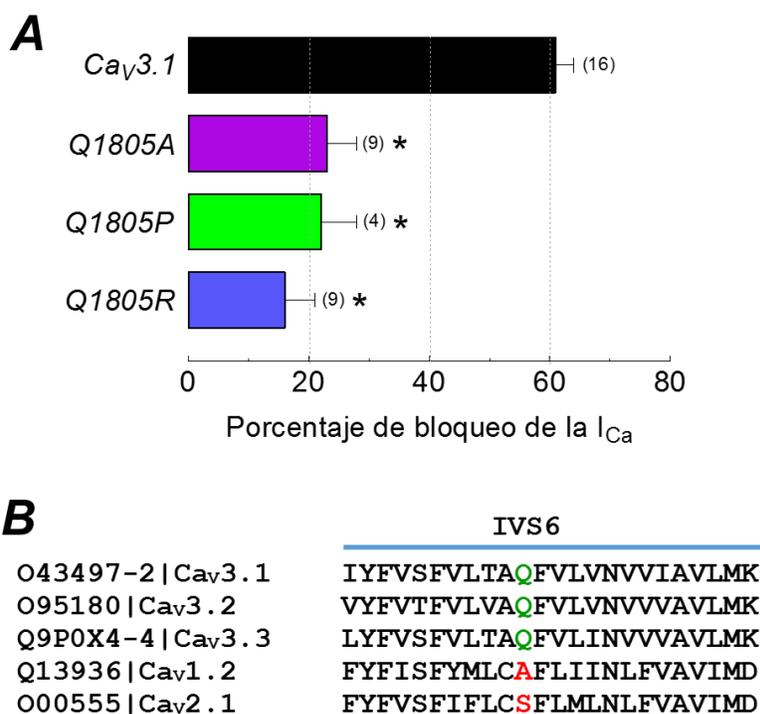


Figura 7. La glutamina Q1805 forma parte del sitio de unión del TTA-A2 en los canales $Ca_v3.1$ y se conserva únicamente en la subfamilia de canales Ca_v3 . **A**, Porcentaje de bloqueo (promedio \pm error estándar) inducido por 3 μ M de TTA-A2 en el canal $Ca_v3.1$ silvestre y las mutantes indicadas. Se observa claramente que el efecto del TTA-A2 es modificado por las sustituciones indicadas de la glutamina Q1805. Modificada de [68]. **B**, Alineamiento de las secuencias de los segmentos S6 de los tres miembros de la subfamilia Ca_v3 (tipo T), y el de un canal HVA tipo L ($Ca_v1.2$). La glutamina (Q, en verde) se conserva únicamente en los canales tipo T.

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido al bloqueo preferencial que ejerce la amilorida en el canal $Ca_v3.2$ con una diferencia de un orden de magnitud con respecto a los otros dos miembros de los canales tipo T ($Ca_v3.1$ y $Ca_v3.3$), resultará importante encontrar el sitio de unión a la amilorida en el canal $Ca_v3.2$, así como establecer si este sitio de unión es diferente al descrito por nuestro grupo de investigación en el canal $Ca_v3.1$ para los bloqueadores tipo TTA. La información estructural del canal $Ca_v3.2$ existente al momento de iniciar el presente trabajo de tesis consistía en un modelo tridimensional de la proteína obtenido por homología con el canal de potasio KcsA. Cabe mencionar, que hasta este momento, no existen estructuras cristalográficas de los canales de calcio tipo T.

Un modelo tridimensional de $Ca_v3.2$ y simulaciones de *docking*, pueden proporcionar información básica fundamental sobre la interacción fármaco-proteína, misma que puede ser relevante para diseñar fármacos de manera racional que tengan una mayor afinidad y especificidad sobre estos canales. El propósito final es el de generar información científica que pueda contribuir al tratamiento de los padecimientos en los que este canal se ha involucrado tales como respuesta analgésica de neuronas de sistema nervioso periférico, [75], ataxia cerebelosa [76] epilepsia [77], autismo [78], desordenes cognoscitivos [79] y cáncer [80].

4 OBJETIVOS

Objetivo General

Obtener información estructural del sitio de unión de la amilorida en el canal $Ca_v3.2$.

Objetivos Particulares

- Construir mutantes del canal $Ca_v3.2$ en los dominios I y IV a partir de la información proporcionada con las simulaciones de *docking* en el modelo tridimensional del canal $Ca_v3.2$ obtenido por homología con el canal de potasio KcsA.

- Investigar el efecto de las mutaciones del canal $Ca_v3.2$ en el bloqueo por amilorida, en comparación con el observado en el canal silvestre.
- Cuantificar el bloqueo de las mutantes Q1805A, Q1805R, Q1805S, Q1805P del canal $Ca_v3.1$ por el fármaco amilorida.
- Obtener las mutantes Q1848G, Q1848R y Q1848P a partir de la mutación puntual en la posición Q1848 del canal $Ca_v3.2$, equivalente a la glutamina Q1805 en el canal $Ca_v3.1$
- Cuantificar el bloqueo de las mutantes Q1848G, Q1848R, Q1848P inducido por la amilorida y el compuesto TTA-A2 para comparar con el canal silvestre.

5 HIPÓTESIS

- Sí el sitio de unión de la amilorida está formado por los aminoácidos o algunos de ellos, sugeridos por las simulaciones de *docking* en el modelo del canal $Ca_v3.2$, entonces la mutación puntual de tales aminoácidos, deberá modificar el bloqueo del canal $Ca_v3.2$ inducido por el diurético.
- Debido a las diferencias estructurales entre amilorida y el TTA-A2, así como las diferencias en la IC_{50} de cada uno de ellos, es posible anticipar que el sitio de unión a la amilorida no corresponde con el descrito previamente para TTA-A2 en el canal $Ca_v3.1$.
- Considerando que el sitio de unión del TTA-A2, sugerido por el modelo basado en el canal $Ca_v3.1$, se conserva también en $Ca_v3.3$ y que dicha secuencia también se conserva en el canal $Ca_v3.2$, entonces el sitio de unión del TTA-A2 también deberá conservarse en el canal $Ca_v3.2$.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Construcción de canales mutantes del canal $Ca_v3.2$

Para generar cada una de las mutaciones puntuales en el canal $Ca_v3.2$ (Tabla 3), se utilizó la técnica de extensión por empalme de PCR también conocida como PCR SOEing [81, 82]. Brevemente, el molde de DNA para generar la reacción fue el DNA complementario (cDNA) del canal $Ca_v3.2$ (GenBank AF051946) [83]. Para cada mutante se utilizaron cuatro oligonucleótidos o *primers*. Dos de ellos, funcionan como iniciadores o cebadores para delimitar el fragmento de DNA mutante (*primers* candado), y los otros dos son los *primers* mutagénicos, mismos que en su secuencia contienen la mutación a introducir.

La técnica de PCR SOEing consta de tres reacciones (Fig. 8). La primera (PCR1), fue producida con el *primer* candado sentido (*Forward*) y el *primer* muta-génico antisentido (*Reverse*). La segunda (PCR2), incluye el *primer* candado antisentido y al *primer* muta-génico sentido. Para ambos casos como ya se mencionó anteriormente, se utilizó como molde el DNA que codifica para el canal $Ca_v3.2$; además de la *polimerasa* Deep Vent (New England BioLabs; Ipswich, MA, EUA), dNTP's (25 mM, Invitrogen, Carlsbad CA, EUA); amortiguador y H_2O para un volumen final de 50 μ l. La tercera reacción (PCR3), consistió en la amplificación del fragmento mutante completo, para lo cual se utilizó como templado a las reacciones PCR1 y PCR2 en concentraciones equimolares, además de los *primers* candado y los reactivos antes mencionados.

Las reacciones de PCR, se llevaron a cabo en un termociclador Veriti (Applied Biosystems, Carlsbad CA, EUA), utilizando las siguientes condiciones de reacción: una primera etapa que consiste en un ciclo de desnaturalización de DNA (30 s a 94°C). La segunda etapa, constó de 33 ciclos consecutivos con tres fases cada uno de ellos: desnaturalización (30 s a 94°C), hibridación (30 s a 61°C); y extensión (90 s a 72°). La tercera y última etapa, tuvo como propósito la extensión final del producto (5 min a 72°). Todos los productos generados por PCR, fueron caracterizados por electroforesis para comprobar que se obtuviera el tamaño esperado del fragmento mutante. Los productos de la PCR3, fueron purificados y clonados en un vector de tránsito para amplificar el DNA y regresarlos finalmente al canal completo $Ca_v3.2$ contenido en el vector pcDNA3 (WT) para generar cada uno de los canales mutantes. El vector de tránsito utilizado fue el

pJET 1.2/Blunt del kit CloneJET PCR Cloning (Fermentas-Thermo Scientific Waltham, MA, EUA). La ligación, se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l, a 22°C durante 30 min, de acuerdo a las indicaciones del vendedor.

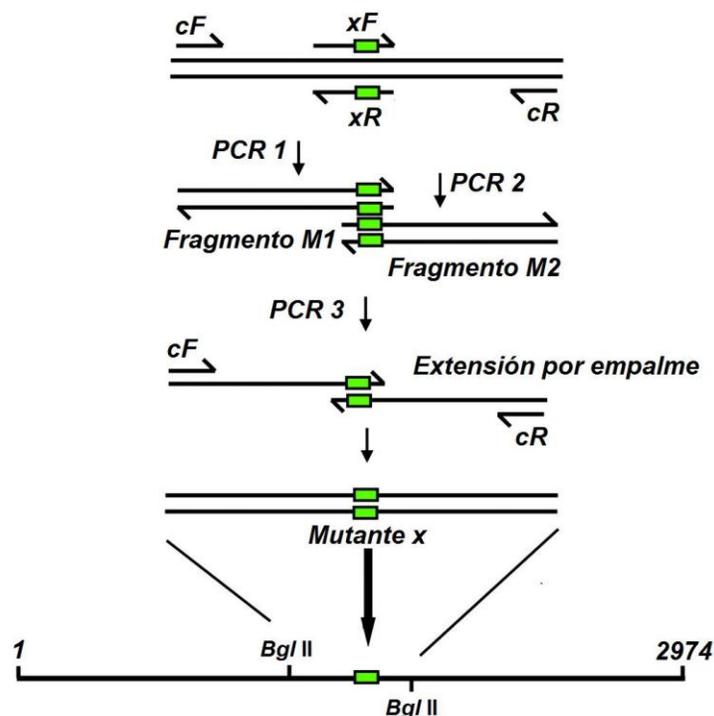


Figura 8. Esquema general de la técnica de PCR SOEing o extensión por empalme utilizada en la mutagénesis del canal Ca_v3.2. Se ilustran las tres reacciones de PCR que se realizaron para generar el fragmento de DNA que contiene la mutación puntual, el cual se subclonó en el vector de expresión pJET1.2/Blunt conformado 2974 pb y que contiene dos sitios de restricción para Bgl II, flanqueando el sitio de ligación de los fragmentos de PCR. Tomada de [68].

Un volumen, generalmente de 7 μ l de la ligación, se utilizó para transformar bacterias *E. coli* DH5 α para incorporar a la célula procarionte el plásmido que contenía al vector de clonación, más el fragmento mutante. Las bacterias fueron sembradas en placas de agar con medio de lisogenia (LB) suplementado con 100 μ g/ml de ampicilina e incubadas a 37°C durante 16 h. Posteriormente, se seleccionaron varias colonias de cada placa y se amplificaron en medio LB líquido con ampicilina; nuevamente incubando a 37°C durante 16 h, con la diferencia que en esta ocasión el cultivo se mantuvo en constante agitación a 250 rpm.

Por último, a partir de estos cultivos de bacterias se realizó la extracción y purificación del DNA plasmídico mediante un procedimiento estándar de lisis alcalina [82]. La presencia del fragmento mutante ligado en el vector, se comprobó por análisis de restricción del DNA plasmídico con la enzima Bgl II, separado por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Finalmente, el DNA plasmídico con el inserto del tamaño correcto fue enviado a secuenciar a la Unidad de Biología Molecular del IFC, para comprobar la presencia de la mutación deseada. Una vez confirmada la presencia de la mutación deseada, el fragmento de DNA que contiene la mutación fue ligado en el plásmido que contiene la secuencia completa del canal $Ca_v3.2$ (pcDNA3.1-Cav3.2), mediante la estrategia de corte y pegado utilizando diferentes enzimas de restricción y la enzima T4 DNA Ligasa (New England BioLabs). Para las mutantes del dominio I de la subunidad $\alpha1H$ del canal $Ca_v3.2$, se utilizó la enzima Asc I (ver Fig. 10) y para las del dominio IV, se utilizaron las enzimas Avr II, Age I y Xba I (ver Fig. 11).

Tabla 3. Mutantes del canal $Ca_v3.2$ utilizadas en el presente trabajo

Ubicación	Aminoácido sustituido	Aminoácidos introducidos	Mutantes generadas
Dominio I	N (287)	S, Y, E, D, H	N287S, N287Y, N287E, N287D, N287H
Dominio IV	S (1836)	A, R, P	S1836A, S1836R, S1836P
Dominio IV	P (1837)	F, I, S, T, Y	P1837F, P1837I, P1837S, P1837T, P1837Y
Dominio IV	Q (1848)	G, R, P	Q1848G, Q1848R, Q1848P

Se utilizó la nomenclatura de una sola letra para identificar a los diferentes aminoácidos. Entre paréntesis, se indica la posición que ocupa cada aminoácido dentro de la secuencia completa de la proteína del canal $Ca_v3.2$ (UniProt 095180).

6.2 Cultivo y transfección de células HEK-293 con los canales Ca_v3 .

Las células HEK-293 constituyen una línea celular inmortalizada, aislada de un tumor renal de embrión humano y se utilizan frecuentemente como sistema de expresión heterólogo, ya que tienen la ventaja de carecer de corrientes de calcio nativas. Las células se crecieron en monocapas sobre cajas Petri de plástico, de 100 mm de diámetro, utilizando medio de cultivo DMEM (GIBCO-Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), suplementado con 10% de suero fetal bovino, penicilina y estreptomina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los cultivos de células HEK-293 fueron mantenidos bajo condiciones estándar de incubación: temperatura de 37°C y una atmósfera húmeda con 95% de O_2 y 5% de CO_2 .

Todos los registros de corrientes de calcio presentadas en esta disertación, se obtuvieron de células HEK-293 transfectadas transitoriamente con los canales Ca_v3 silvestres y mutantes. Cada transfección se realizó en cajas Petri de 35 mm con una confluencia celular de 70 a 80%, utilizando el protocolo de jetPei (Polyplus Transfection, Illkirch, Francia). Se transfectó el cDNA de las subunidades $\alpha 1$ de los canales $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.2$ (silvestres y mutantes), además del cDNA de la proteína verde fluorescente (GFP), que sirvió como gen reportero. Después de 24 a 72 h de la transfección, se realizaron los registros electrofisiológicos para investigar la actividad de los canales Ca_v3 , solo en aquellas células que expresaron la GFP.

6.3 Sembrado de células para registro electrofisiológico

Una vez transcurridas las primeras 24 h después de la transfección, se resembraron las células de la caja Petri de 35 mm donde se llevó a cabo la transfección de las mismas. Primeramente se retiró el medio de cultivo y luego se realizó un lavado con una solución amortiguadora de fosfatos conocida como PBS. Posteriormente, las células se despegaron mediante una incubación de 3-5 min con una solución que contenía 0.05% de tripsina y 0.53 mM de EDTA. Finalmente, las células se disociaron al adicionar 1 ml de medio completo y resuspender mecánicamente con la ayuda de la micropipeta de 1 ml. Una alícuota (100-120 μ L, generalmente) de esta suspensión celular fue sembrada en otra caja Petri de 35 mm, la cual ya contenía 1.9 ml de medio DMEM suplementado y pequeños cubreobjetos de vidrio (de alrededor de 25 mm² de área) en el fondo de la misma. A la caja Petri de 35 mm con el remanente de las células transfectadas, se le agregó 1 ml de medio completo y al igual que la caja Petri con las células para registro, fueron mantenidas nuevamente en condiciones estándar de incubación durante al menos dos horas antes de iniciar los registros electrofisiológicos.

6.4 Experimentos electrofisiológicos

6.4.1 Soluciones de registro

Los registros electrofisiológicos requieren de soluciones para simular el ambiente intracelular y extracelular de la célula bajo estudio. En nuestras condiciones experimentales, las soluciones

internas (contenidas dentro de la pipeta del electrodo de registro) y externas (con las que se perfunde continuamente la cámara de registro) contenían la siguiente composición:

- Solución interna 8A: 135 mM CsCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES, 4 mM ATP y 0.3 mM TRIS GTP. pH = 7.4 ajustado con CsOH.
- Solución interna 12: 115 mM CsCl, 20 mM CsF, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES. pH = 7.4 ajustado con CsOH.
- Solución externa 39: 160 mM Cloruro de tetra-etil-amonio (TEA-Cl), 10 mM HEPES y 5 mM CaCl₂. pH = 7.4 ajustado con TEA-OH.
- Solución externa 17: 155 mM TEA-Cl, 10 mM HEPES y 10 mM CaCl₂. pH = 7.4 ajustado con TEA-OH.
- Solución externa 36: 140 mM TEA-Cl, 10 mM HEPES y 20 mM CaCl₂. pH = 7.4 ajustado con TEA-OH.

Cabe mencionar, que la solución interna 8A, se suplemento con 4 mM de Mg-ATP y 0.3 mM de Tris GTP, para prevenir cualquier posible “*rundown*” de la corriente de calcio durante los registros electrofisiológicos [84]. La solución interna 12; se utilizó para asegurar que la corriente de fuga (*leaky*) fuera mínima durante el registro; sobre todo de aquellas mutantes que expresaron corrientes pequeñas (usualmente menores a 50 pA de amplitud). La inclusión de fluoruro de Cesio (CsF) en dicha solución, proporciona una mayor estabilidad al sello de alta resistencia entre la pipeta de vidrio y la membrana celular.

6.4.2 Electrodo de registro

Las pipetas o electrodos de registro, se construyeron a partir de capilares de borosilicato (TW150-3; WPI Inc., Sarasota, FL, EUA). Primeramente, estos capilares fueron cortados con un estirador horizontal, modelo P-97 (Sutter Instrument Co., Novato, CA, EUA). Después de esto, las pipetas recién formadas, fueron pulidas con calor, utilizando una microforja (MF-830; Nerishigue Co. Japón) con el fin de eliminar cualquier irregularidad en la punta del electrodo de vidrio generada al momento del estiramiento de las pipetas. Para todos los registros, únicamente se utilizaron electrodos con una resistencia de 2 a 4 MΩ, una vez llenados con solución interna.

6.4.3 Registro de corrientes de calcio con la técnica de *patch-clamp*

El registro de la actividad de los canales de calcio se llevó a cabo con la técnica de *patch-clamp* o por su traducción al español: “fijación de voltaje en pequeñas áreas de membrana”, en la modalidad de célula completa (whole-cell) [85, 86]. El sistema de registro utilizado para la realización de dichos experimentos electrofisiológicos, consiste de un amplificador de *patch-clamp* modelo Axopatch 200B conectado a una interface Digidata 1322 A/D (Fig. 9). 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 interface y el software de adquisición de datos se obtuvieron de Molecular Devices (Sunnyvale, CA, EUA).

La técnica de *patch-clamp*, consiste básicamente, en aislar eléctricamente, una pequeña área de la membrana celular (parche), contenida en una pipeta de vidrio de aproximadamente 1 micrómetro de diámetro. Como resultado, se obtiene la formación de un sello de alta resistencia (del orden de giga ohmios $G\Omega$), entre la punta de la pipeta de registro y la superficie de la membrana celular. Para incrementar la resistencia del sello, se requiere aplicar presión negativa (succión) a través de la pipeta. La formación del sello es monitoreada constantemente mediante la aplicación de un pulso de voltaje (5 mV) al electrodo de registro, lo que se detecta como una corriente resistiva mediante el electrodo de tierra que se encuentra en contacto con la solución de la cámara y el cual cumple con la función de detectar todas las corrientes que fluyen tanto del electrodo de registro como de la célula bajo estudio hacia la cámara de registro. Una vez logrado el gigasello ($> 1G\Omega$) entre la punta de la pipeta de registro y la membrana de la célula a estudiar, se aplica un voltaje constante llamado potencial de mantenimiento (HP) de -100 mV, el cual funciona como potencial de membrana (V_m). Acto seguido, se rompe el sello, permitiendo que la composición iónica del medio intracelular se equilibre casi instantáneamente con la de la solución interna contenida en la pipeta de registro. Finalmente, se cancelan de manera analógica las espigas de corriente capacitiva asociadas a la instalación y corte de los pulsos

hiperpolarizantes de 5 mV. Una vez cancelados los transitorios capacitivos, se registra la actividad de los canales presentes en la membrana plasmática de la célula; para esto, se aplican diversos protocolos de voltaje que se ajustan a la actividad de los canales que se quiera estudiar.

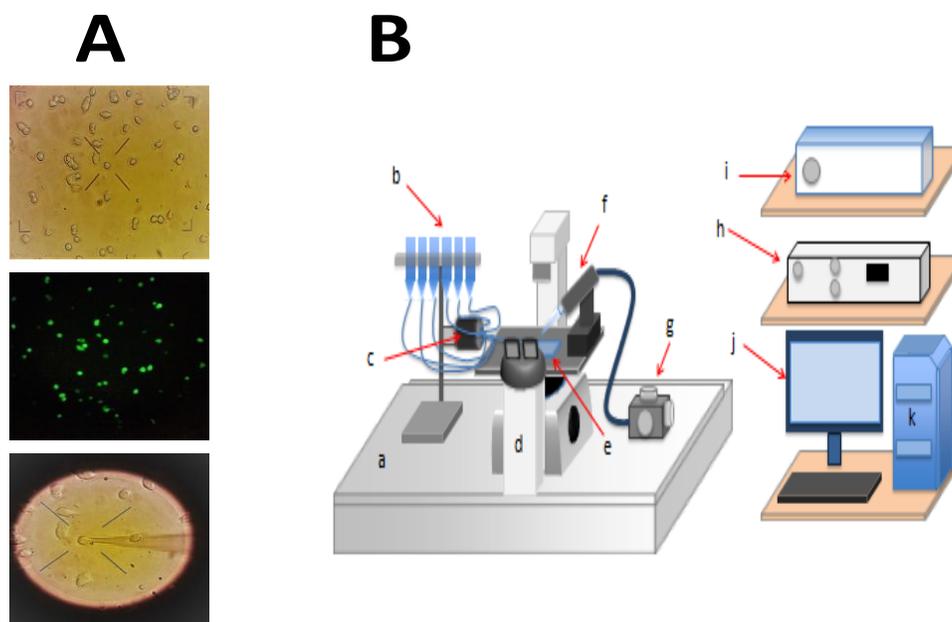


Figura 9. Esquema del sistema de registro empleado en los experimentos de *patch-clamp*. **A**, Fotografías que muestran células HEK 293 transfectadas con las subunidades α de los canales Ca_v3 y que se encuentran sobre un cubreobjetos en el fondo de la cámara de registro. Arriba, se enfoca la célula, justo en el centro de la X formada con las líneas negras de los oculares del microscopio. En medio, el mismo campo mostrando la fluorescencia de la proteína verde. Abajo, se muestra la célula seleccionada con la pipeta de registro con la que se formó el sello de alta resistencia. **B**, Componentes generales del sistema de registro. **a**) Mesa antivibratoria para evitar algún movimiento que pueda interferir con el registro o estabilidad del sello. **b**) Sistema de perfusión impulsado por gravedad. **c**) Válvula giratoria de 6 vías para seleccionar las soluciones externas y dirigir las a una salida en común para irrigar la cámara de registro. **d**) Microscopio óptico invertido para poder observar las células que se van a registrar. **e**) Cámara de registro para colocar e inundar de solución los cubreobjetos donde están adheridas las células. **f**) Cabezal o *headstage* que contiene el amplificador operacional para inyectar y registrar las señales de corriente **g**) Micromanipulador eléctrico para poder realizar pequeños movimientos que faciliten el movimiento del electrodo hacia la célula. **h**) Amplificador de *patch-clamp* para mandar y controlar las señales de corriente. **i**) Interfase o convertidor para transformar la información generada por el amplificador y poder ser interpretada por el software pClamp 9.2. **j**) Monitor y **k**) Unidad central de procesamiento. Modificada de [87].

6.4.4 Protocolos de voltaje

Básicamente, se utilizaron dos tipos de protocolos de voltaje, ambos aplicados a partir de un HP de -100 mV. El primero de ellos, denominado pulso único (SP), que consiste en un pulso despolarizante a -10, -20 o -30 mV de 150 ms de duración, aplicados cada 10 s (0.1 Hz). Dependiendo de la concentración del acarreador de carga, se utiliza uno u otro de estos pulsos;

para 5 mM de calcio en la solución externa por ejemplo, se utiliza el pulso a -30 mV. Previamente, en nuestro laboratorio bajo tales condiciones experimentales la máxima amplitud de la corriente de calcio entrante en los canales Ca_v3 , se alcanza a -30 mV. Este protocolo, se utilizó para registrar constantemente la amplitud de la corriente de calcio y sus variaciones debidas a la perfusión de cualquier fármaco o compuesto a la cámara de registro.

El segundo protocolo fue el IV-100, el cual consiste en una serie de pulsos de 100 ms de duración a voltajes que van desde -80 hasta +80 mV, en incrementos de 10 mV. Los datos obtenidos con este protocolo, permitieron observar la activación de la corriente en función del voltaje, el voltaje al cual se obtiene la corriente de mayor amplitud y establecer si el efecto de algún fármaco modifica estos parámetros.

6.5 Análisis de datos

Los datos obtenidos, fueron analizados y graficados con el software Clampfit de pClamp 10.4 en combinación con los programas de Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA) y Prism 6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Todos los resultados, se expresan como el promedio \pm el error estándar de la fracción de corriente bloqueada con los fármacos amilorida o TTA-A2. Se utilizó la prueba estadística *t de Student* para comparar los promedios y evaluar diferencias significativas entre los grupos. Se consideraba una diferencia significativa, cuando el valor de *P* fue menor a 0.05 con un intervalo de confianza de 95%.

7 RESULTADOS

7.1 Construcción de los canales mutantes

El primer objetivo de la presente tesis fue construir los canales mutantes sugeridos por los las simulaciones de *docking* de la amilorida con el modelo del canal $Ca_v3.2$, obtenido a partir de su homología con el canal de potasio KcsA (ver Tabla 3). De los varios aminoácidos sugeridos por el *docking*, se decidió mutar a 3 de los aminoácidos propuestos, la asparagina 287 (N287, Dominio I), la serina 1836 y prolina 1837. (S1836, P1837, Dominio IV). La estrategia utilizada para construir las mutantes del Dominio I se resume en la Fig. 10, y las del Dominio IV en la Fig. 11.

Los fragmentos mutantes del Dominio I generados por la reacción 3 de PCR-SOEing (1751 pb) fueron subclonados en el vector pJET1.2/Blunt (Fig. 10, panel A y B). Una vez confirmada la presencia de la mutación correcta mediante la secuenciación respectiva, los fragmentos mutantes fueron digeridos con la enzima Asc I para ser extraídos del vector mencionado y clonados en los sitios respectivos (nucleótidos 1093 y 2707) de la secuencia completa del canal $Ca_v3.2$ -WT para generar el canal mutante completo (pcDNA3+Cav3.2m; Fig. 10, panel C y D). Con esta estrategia se generaron las mutantes N287S, N287Y, N287E, N287D y N287H.

La estrategia utilizada para generar las mutantes del Dominio IV difirió de la descrita arriba en que la construcción de los canales mutantes completos, requirió de la ligación de tres fragmentos en lugar de dos (Fig. 11). Los fragmentos mutantes fueron liberados del vector pJET1.2/Blunt con las enzimas Age I y Avr II generando un producto de 2249 pb (Fig. 11, panel C, gel izquierdo). Paralelamente, el plásmido que contiene el canal $Ca_v3.2$ silvestre (pcDNA3+Cav3.2) se digirió con las enzimas Age I y Xba I para obtener un fragmento de 9350 pb; y con las enzimas Xba I y Avr II para obtener el fragmento de 1649 pb (Fig. 11C, gel derecho). Los tres fragmentos fueron unidos mediante una reacción de ligación con T4 Ligasa para generar el canal mutante completo (Fig. 11D). Con esta estrategia se produjeron las mutantes S1836A, S1836R, S1836P, P1837F, P1837I, P1837S, P1837T y P1837Y, Q1848R, Q1848G y Q1848P.

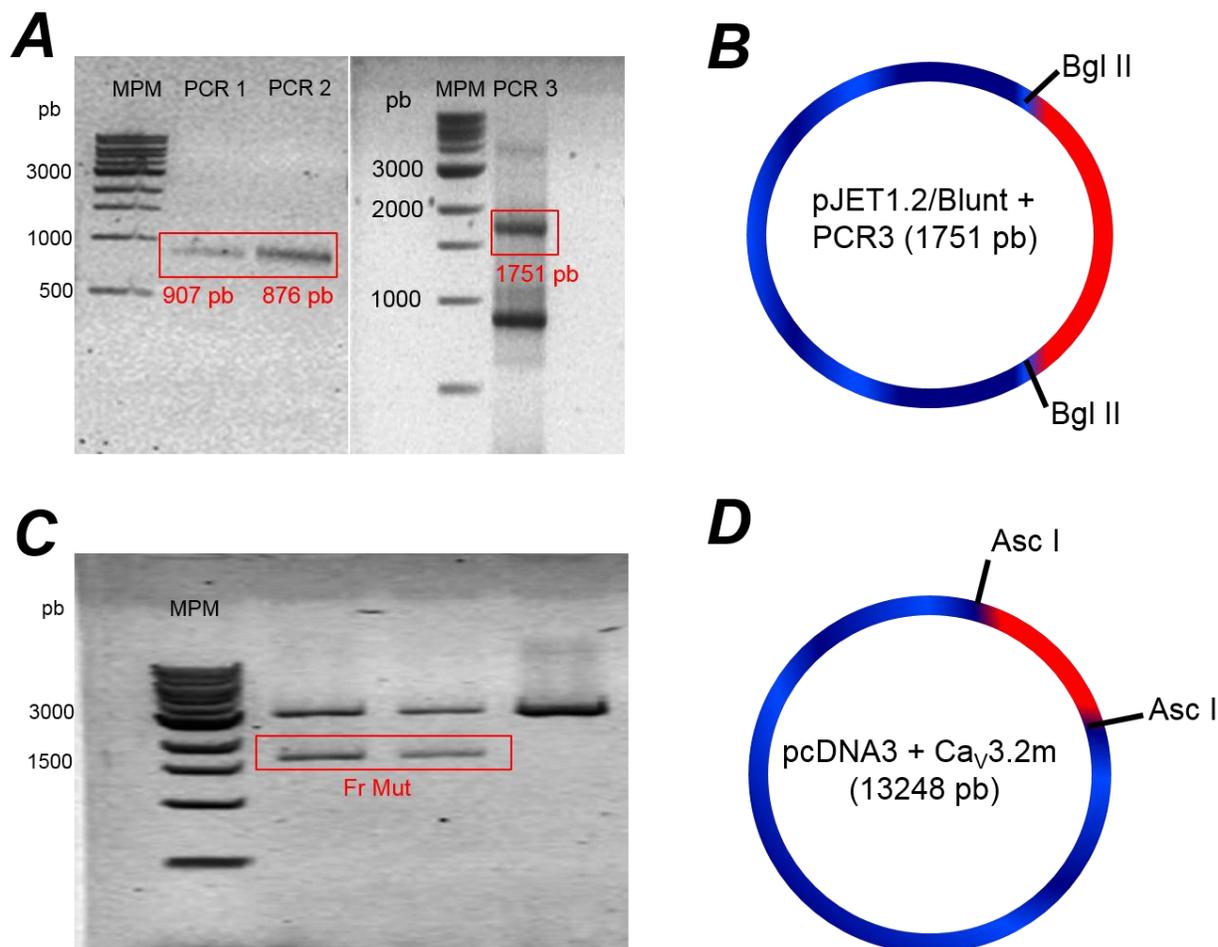


Figura 10. Estrategia experimental para generar los canales Ca_v3.2 mutantes del Dominio I. **A**, Fotografías de los geles de agarosa al 1% que muestran los amplicones de las tres reacciones de la técnica de PCR SOEing o extensión por empalme utilizada para generar las mutantes del Dominio I del canal Ca_v3.2. **B**, La reacción PCR 3 se subclonó en el vector pJET1.2/Blunt y se caracterizó con la enzima Bgl II. **C**, Las clonas positivas (mutación corroborada por secuenciación) fueron digeridas con la enzima Asc I para liberar el fragmento mutante (Fr Mut; 1615 pb) de pJET1.2/Blunt y ligarlo en los mismos sitios de Asc I en el canal Ca_v3.2-WT con la técnica de corte y pegado. **D**, obtención del canal Ca_v3.2 mutante (pcDNA3 + Ca_v3.2m). En todos los casos, en el carril marcado como MPM se cargó el marcador de tamaño molecular de 1 Kb, con los tamaños indicados en pares de bases (pb).

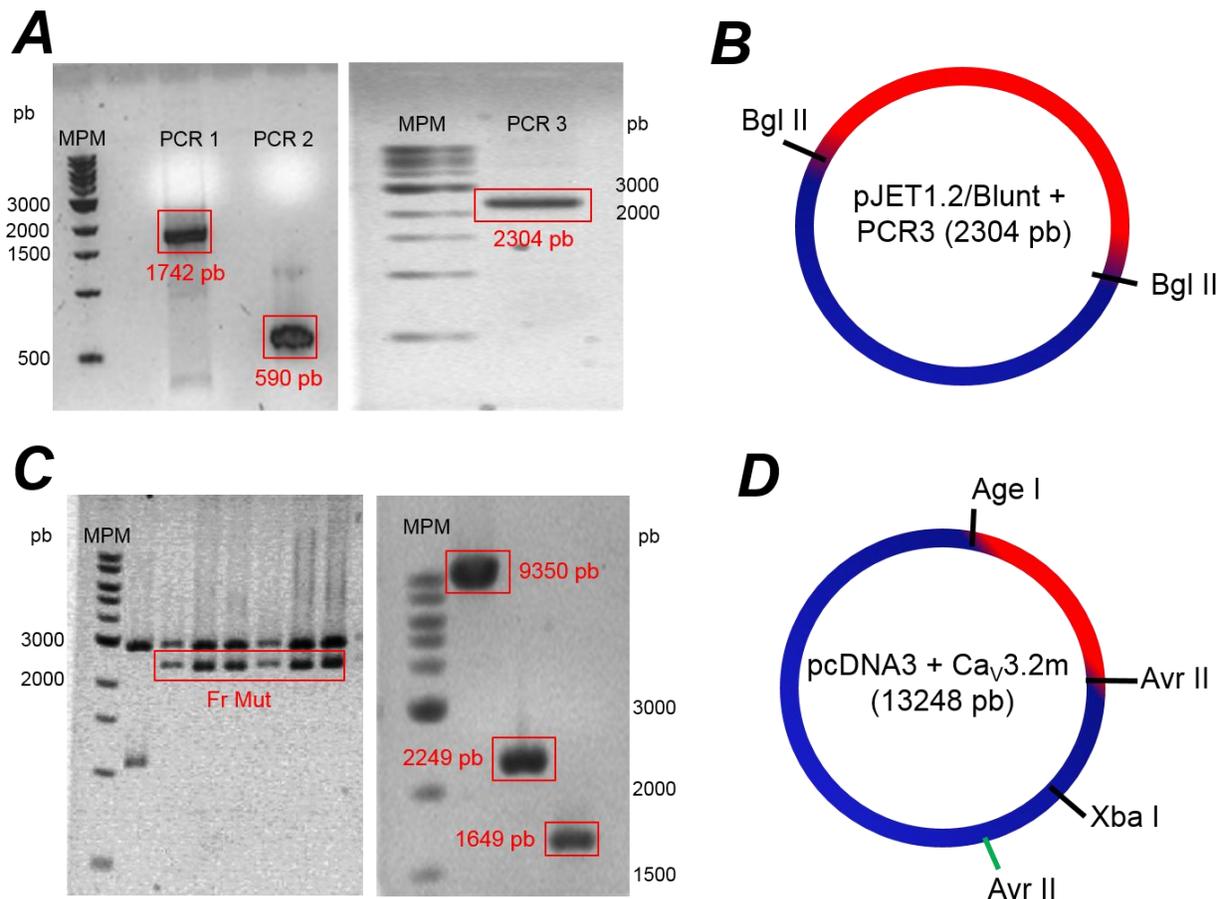


Figura 11. Estrategia empleada en la generación de canales Ca_v3.2 mutantes del Dominio IV. **A**, Fotografías de geles de agarosa al 1% que muestran los amplicones obtenidos de las tres reacciones de PCR SOEing utilizados para generar mutantes del Dominio IV del canal Ca_v3.2. **B**, El amplicón de la PCR 3 (2304 pb) se subclonó en el vector pJET1.2/Blunt para identificar las clonas con la mutación correcta. **C**, Geles de agarosa al 1%. La separación del fragmento mutante (2249 pb) de las clonas positivas mediante la digestión con las enzimas Age I y Avr II se muestra en el gel izquierdo. Los fragmentos utilizados para construir los canales Ca_v3.2 mutantes del Dominio IV se muestran en el gel de la derecha. Los fragmentos de 9350 y 1649 pb se obtuvieron del canal Ca_v3.2-WT y el de 2249 pb de la clona positiva para la mutación correspondiente. **D**, Ilustración de los sitios de las enzimas utilizados para generar los canales Ca_v3.2 mutantes del dominio IV. Para evitar la interferencia del sitio de Avr II indicado con la línea verde, se generó el fragmento de 9350 pb mediante la digestión del plásmido con las enzimas Age I y Xba I, por lo que la generación de los canales mutantes completos se llevó a cabo con tres fragmentos como se describe en el texto principal.

Una vez obtenidas las construcciones finales, cada una de ellas fue caracterizada mediante digestión con enzimas de restricción. El resultado de la digestión, fue visualizado por electroforesis con geles de agarosa al 1% (Fig. 12). Las clonas positivas caracterizadas por electroforesis fueron secuenciadas en la Unidad de Biología Molecular del IFC.

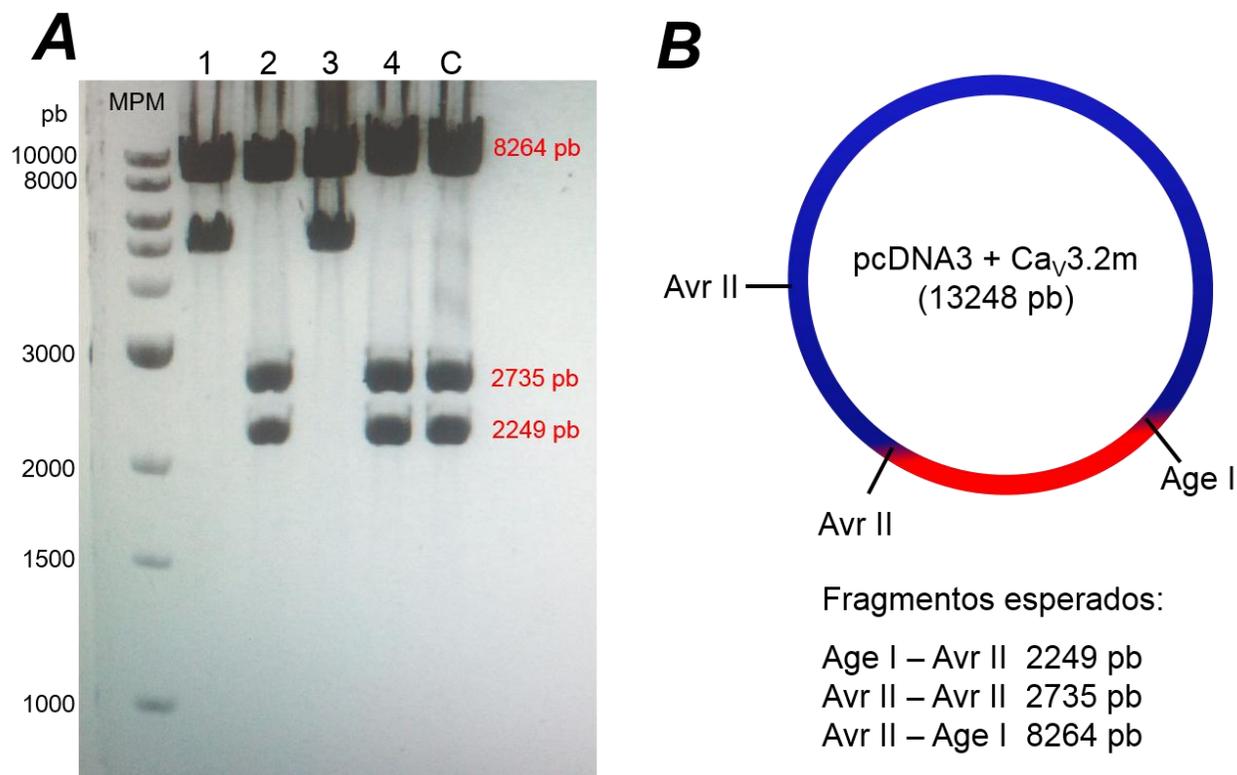


Figura 12. Caracterización enzimática de las construcciones finales del Dominio IV. **A**, Separación por electroforesis de los productos generados por la reacción de digestión con las enzimas AvrII y AgeI de las construcciones finales de los canales mutantes del dominio IV. El DNA de cuatro diferentes clonas fue digerido y los tamaños de los productos esperados se indican en color rojo. Las clonas 2 y 4 fueron positivas al mostrar los tres fragmentos de los tamaños esperados indicados en el panel **B**. En el carril C, se cargó la reacción de digestión del DNA canal Ca_v3.2–WT como control positivo.

7.2 Efecto de la amilorida sobre los canales mutantes de Ca_v3.2 que se generaron con base al modelo del canal de KcsA

Los canales Ca_v3.2 silvestre (WT) y mutantes fueron expresados en células HEK-293 mediante transfecciones transitorias y su actividad se registró con la técnica de *patch-clamp* en la configuración de célula completa en presencia de calcio como acarreador de carga en las soluciones de registro. En la Fig. 13 se presentan de manera resumida los resultados obtenidos con este tipo de experimentos. Después de alcanzar un nivel de corriente estacionario (trazo negro, Fig. 13A), se adicionó 100 μ M de amilorida a la solución que baña las células y se observó una disminución cercana al 55% en la amplitud de la corriente a -30 mV. El bloqueo estacionario se alcanzó aproximadamente 3 min después de haber iniciado la perfusión con amilorida (Fig. 13A, panel derecho). Posteriormente, al volver a perfundir la cámara de registro con la solución control para retirar la amilorida (Lavado), la amplitud de la corriente aumento paulatinamente hasta alcanzar un valor muy similar a la condición Control. Experimentos similares se ilustran para los canales mutantes N287Y (paneles B), S1836P (paneles C); y P1837T (paneles D). Se puede observar que la fracción de corriente de calcio bloqueada por amilorida fue ligeramente mayor en la mutante N287Y, mientras que las mutantes S1836P y P1837T fueron menos sensibles al bloqueo por el diurético, ya que la fracción de corriente bloqueada fue menor que en el canal Ca_v3.2-WT (Fig. 13A). De hecho, estas dos mutantes fueron las únicas que presentaron diferencias significativas en el porcentaje de corriente bloqueada por 100 μ M de amilorida, después de registrar 98 células HEK-293 transfectadas con las 12 mutantes del canal Ca_v3.2 exploradas en esta sección, tal y como se ilustra en la Fig. 14. Cabe mencionar que la mutante P1837Y no fue funcional, ya que no se registraron corrientes en 7 células estudiadas con la técnica de *patch-clamp*. El porcentaje de bloqueo de la corriente de calcio inducido por 100 μ M de amilorida fue de $55 \pm 2\%$ ($n = 21$), mientras que para la mutante S1836P y P1837T fue de $43 \pm 4\%$ ($n = 7$) y $44 \pm 5\%$ ($n = 8$), respectivamente. Ambas medias fueron estadísticamente diferentes del control ($P < 0.05$). Además de que las diferencias no son sustanciales con respecto al control (alrededor de 20%), el hecho de que las otras mutaciones donde se intercambió el mismo residuo pero por otros aminoácidos no mostraron diferencias respecto al canal silvestre (p.ej., S1836A y P1837S), sugiere que los efectos observados son debidos a posibles modificaciones en la estructura de la hélice alfa del segmento S6 por la presencia de la prolina y de la treonina, y no a

que dichos residuos (la S1836 y la P1837) formen parte del sitio de unión a amilorida. Si este fuera el caso, la sustitución de la S1836 y la P1837 por cualquier aminoácido debería de haber generado una disminución en el bloqueo de la amilorida, situación que no fue observada.

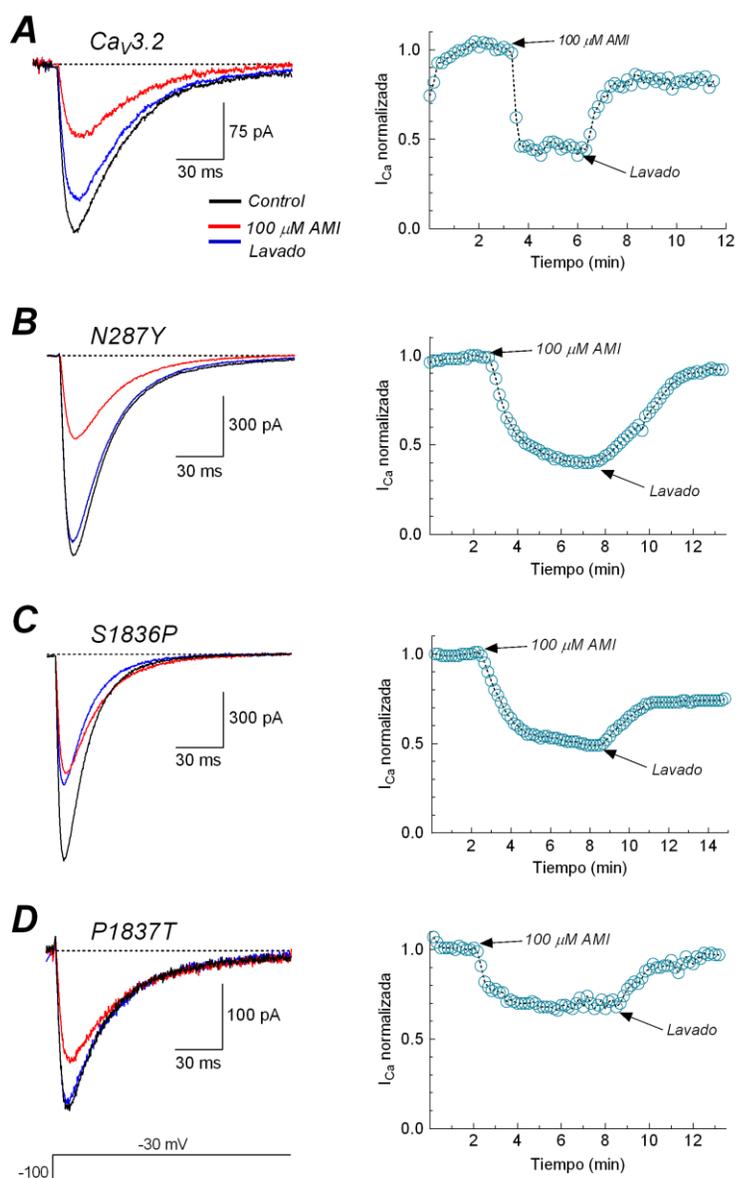


Figura 13. Bloqueo de la corriente de calcio por amilorida en el canal $Ca_v3.2$ silvestre y mutantes construidos con base en el modelo del canal $KcsA$. Trazos representativos de corriente a -30 mV (paneles a la izquierda) y cursos temporales (paneles a la derecha) obtenidos de células HEK-293 transfectadas con el canal $Ca_v3.2$ silvestre (**A**), y las mutantes N287Y (**B**), S1836P (**C**) y P1837T (**D**), en respuesta al efecto de la amilorida. En cada caso se presentan trazos de corriente obtenidos antes (Control), durante (100 μ M amilorida) y después de retirar el diurético (Lavado) de la cámara de registro. Con el propósito de observar mejor los cambios en la amplitud de la corriente, en los gráficos del curso temporal los valores de corriente fueron normalizados con respecto a la amplitud registrada justo antes de iniciar la perfusión de la cámara de registro con la solución que contiene la amilorida. Como se indica en el protocolo de voltaje ilustrado al pie de la figura, el HP fue siempre de -100 mV.

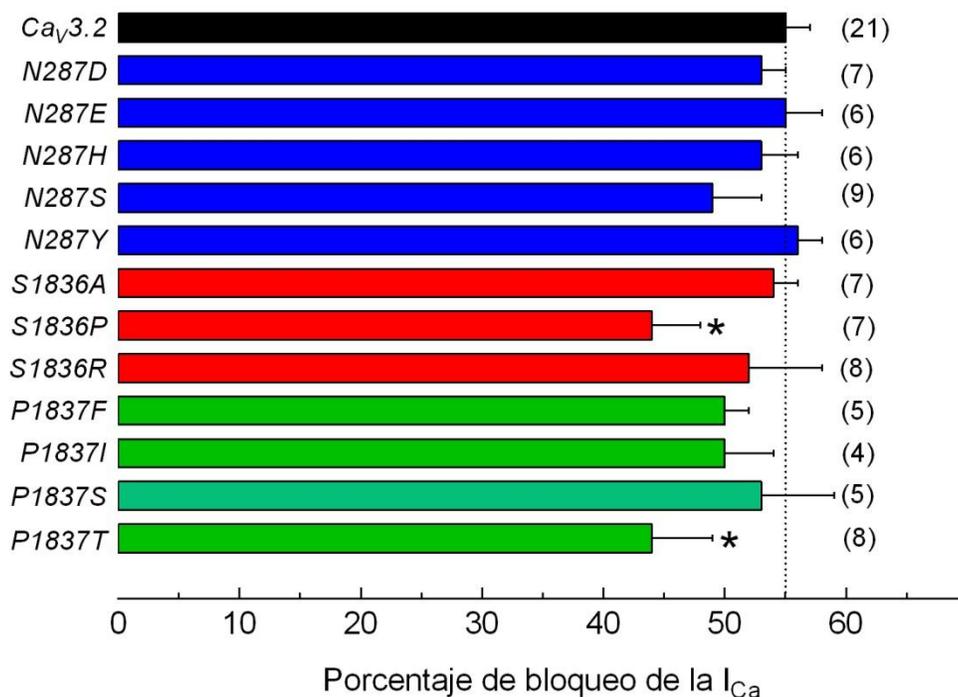


Figura 14. Porcentaje de la inhibición de corriente de calcio en los canales $Ca_v3.2$ silvestre y mutantes en presencia 100 μ M de amilorida. Las barras muestran el promedio \pm el error estándar; y el número de células investigadas se indica entre paréntesis. Las mutantes que presentaron una inhibición de corriente estadísticamente diferente con respecto al canal silvestre se distinguen con un asterisco ($P < 0.05$).

Los resultados obtenidos con las mutantes documentadas en la Fig. 14 demuestran que los aminoácidos N287, S1836 y P1837 no forman parte del sitio de unión de la amilorida en el canal $Ca_v3.2$. Por lo tanto, decidimos abordar esta pregunta desde otra perspectiva. Recientemente, un estudiante de nuestro laboratorio, Fis. Eduardo Chávez Colorado, demostró que una glutamina del segmento S6 del canal $Ca_v3.1$ es parte fundamental del sitio de unión al compuesto TTA-A2, un antagonista de alta afinidad de los canales de calcio tipo T [66]. Para tal fin, Eduardo generó un modelo por homología del canal $Ca_v3.1$ utilizando la información cristalográfica de un canal de sodio de bacteria [67]. Con base en los resultados de Eduardo, nuestra pregunta fue redirigida a dicho sitio de unión, es decir, ¿el sitio de unión a la amilorida es el mismo que el del TTA-A2? Para responder tal pregunta, lo primero que hicimos fue investigar el efecto de la amilorida en dos mutantes de la Q1805 del canal $Ca_v3.1$, la Q1805A y la Q1805R, mismos que proporcionaron las evidencias más contundentes en el caso del sitio de unión al TTA-A2 [88].

7.3 Efecto de la amilorida en el aminoácido Q1805 del canal $\text{Ca}_v3.1$

Las mutantes Q1805A y Q1805R empleadas en la presente disertación fueron construidas previamente en nuestro laboratorio [89] con estrategias de PCR similares a las descritas en la sección de Métodos. Los resultados electrofisiológicos del efecto de la amilorida en estas dos mutantes se resumen en las Fig. 15. Primeramente, los registros representativos y cursos temporales del bloqueo de la I_{Ca} generada por los canales $\text{Ca}_v3.1$ -WT y las dos mutantes se ilustran en los paneles A, B y C. En estos experimentos se utilizó 500 μM de amilorida ya que la IC_{50} que hemos reportado para estos canales es de alrededor de 850 μM , aproximadamente 10 veces más que para $\text{Ca}_v3.2$ [55].

Por otro lado, la pequeña densidad de corriente generada por las células HEK-293 transfectadas con la mutante Q1805R (Fig. 15C) demandó aumentar la concentración del acarreador de carga en la solución externa de registro de 5 a 10 mM. Así, el uso de 500 μM de amilorida en combinación con 10 mM de Ca^{2+} en la solución externa de registro propició un bloqueo cercano al 50% de la I_{Ca} generada por el canal $\text{Ca}_v3.1$ silvestre (Fig. 15D). Por su parte, las mutantes no presentaron diferencias significativas respecto al canal silvestre, no obstante que el canal Q1805R mostró una tendencia a resistir más el efecto bloqueador de 500 μM de amilorida, ya que el bloqueo fue de $33 \pm 5\%$ ($n = 4$) comparado con $51 \pm 8\%$ ($n = 6$) del canal $\text{Ca}_v3.1$ silvestre.

Con el propósito de obtener más evidencias del posible efecto distintivo de la amilorida sobre la mutante Q1805R, se realizó una serie de experimentos adicionales de las mutantes de la glutamina 1805 utilizando una solución externa con 20 mM de Ca^{2+} como acarreador de carga con el fin de aumentar aún más la amplitud de la corriente en las mutantes y descartar posibles artefactos debido a la relación señal/ruido en la medición de las corrientes, principalmente de la mutante Q1805R. De esta manera, se logró registrar corrientes que fueron generalmente de mayor amplitud que en presencia de 10 mM de Ca^{2+} (Fig. 16A). Esta maniobra experimental aunado al hecho de registrar un número mayor de células proporcionó un porcentaje de bloqueo promedio de $28 \pm 5\%$ ($n = 7$), el cual fue significativamente diferente del registrado para el canal $\text{Ca}_v3.1$ silvestre ($47 \pm 3\%$; $n = 11$; Fig. 16B).

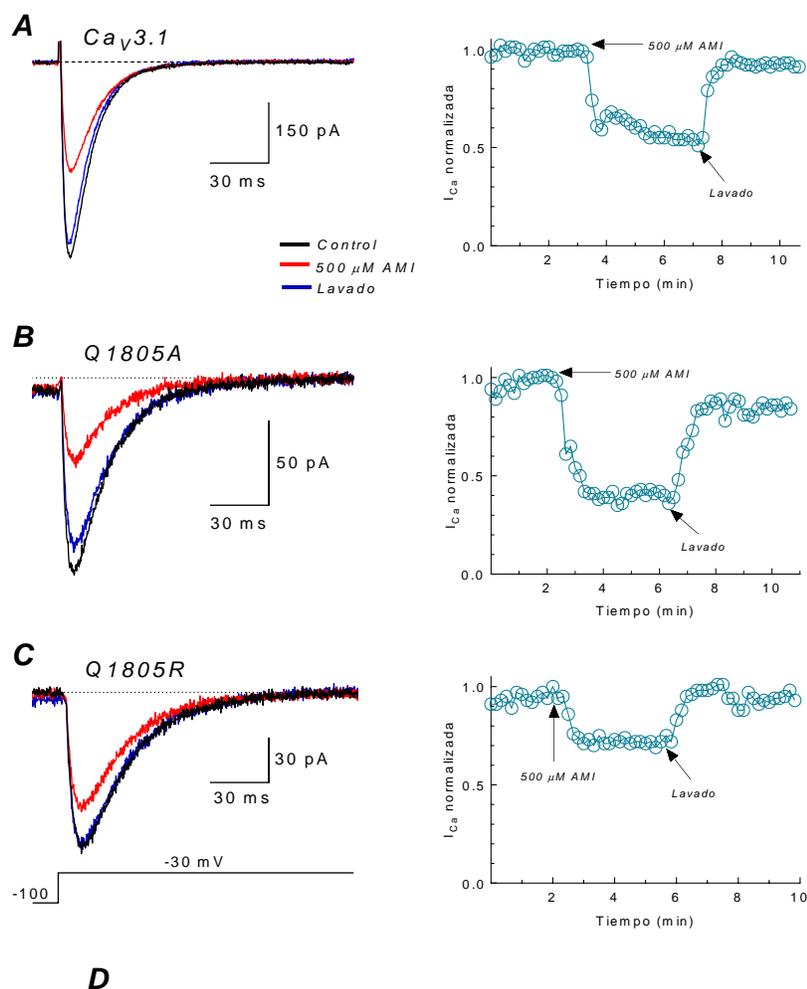


Figura 15. Efecto de la amilorida en los canales Ca_v3.1 silvestre y mutantes del Dominio IV. **A, B** y **C**, Trazos representativos de corriente a -30 mV (paneles a la izquierda) y cursos temporales (paneles a la derecha) obtenidos de células HEK-293 transfectadas con los canales indicados en cada panel, en respuesta al efecto de la amilorida. Nuevamente, se presentan trazos de corriente obtenidos antes (Control), durante (500 μM amilorida) y después de retirar el diurético (Lavado) de la cámara de registro. En este caso la solución externa de registro contenía 10 mM de Ca⁺² como acarreador de carga. En los gráficos del curso temporal los valores de corriente fueron normalizados con respecto a la amplitud registrada justo antes de iniciar la perfusión de la cámara de registro con la solución que contiene la amilorida. **D**, Porcentaje de la inhibición de corriente de calcio en los canales Ca_v3.1-WT y mutantes en presencia del fármaco amilorida. Las barras muestran el promedio ± el error estándar; y el número de células investigadas se indica entre paréntesis. La aplicación de la prueba estadística t de Student (P < 0.05) demostró que no existen diferencias significativas entre los promedios del porcentaje de bloqueo por amilorida de los tres tipos de canales estudiados.

En esta ocasión se analizaron dos mutantes adicionales: Q1805P y Q1805S, cuyos valores promedio de bloqueo no fueron estadísticamente diferentes del canal silvestre, no obstante que también se observó una tendencia de la amilorida a bloquear menos la corriente de calcio de estas mutantes (Fig. 16B).

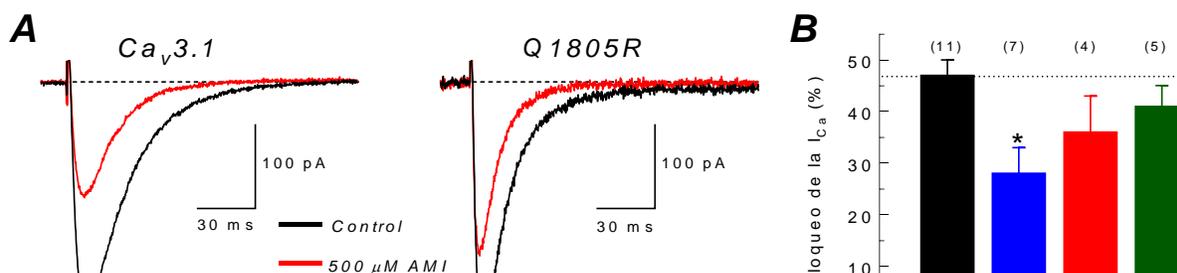


Figura 16. Efecto de la amilorida en los canales $Ca_v3.1$ silvestre y mutantes del Dominio IV en presencia de 20 mM de Ca^{2+} . **A**, Trazos representativos de corriente de calcio a -30 mV en ausencia (Control) y presencia (500 μ M de amilorida) obtenidos de células HEK-293 transfectadas con el canal $Ca_v3.1$ silvestre (registros de la izquierda) y con la mutante Q1805R (registros de la derecha). La solución externa contenía 20 mM de Ca^{+2} como acarreador de carga. **B**, Porcentaje de bloqueo de la corriente de calcio de los canales indicados por la presencia de 500 μ M amilorida. Las barras muestran el promedio \pm el error estándar; y el número de células investigadas se indica entre paréntesis. El asterisco indica diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto al canal silvestre.

Los resultados obtenidos con las mutantes del canal $Ca_v3.1$, particularmente los de la mutante Q1805R, sugieren que probablemente la glutamina Q1805 pudiera formar parte del sitio de unión de la amilorida en el canal $Ca_v3.1$ o que se encuentre en la ruta de acceso del diurético a su sitio de unión. Por ello, se decidió construir más canales mutantes del canal $Ca_v3.2$ en la posición Q1848, la glutamina equivalente a la Q1805 del canal $Ca_v3.1$ (Fig. 7, Antecedentes).

7.4 Bloqueo de los canales mutantes Q1848G y Q1848R por TTA-A2: conservación del sitio de unión a TTAs en el canal $Ca_v3.2$.

Primeramente nos interesó investigar si la glutamina 1848 del canal $Ca_v3.2$ formaba parte del sitio de unión a los TTAs descrito previamente por Eduardo Chávez Colorado [68] en los otros dos

miembros de la subfamilia de canales Ca_v3 , es decir, en el canal $Ca_v3.1$ y el $Ca_v3.3$. En la Figura 17 se resumen los datos obtenidos al exponer las mutantes Q1848 G y Q1848R a la acción de $3 \mu\text{M}$ de TTA-A2. No se presentan resultados de la mutante Q1848P ya que la densidad de corriente expresada por esta mutante fue en extremo pequeña ($-2.5 \pm 1 \text{ pA/pF}$, $n = 4$), por lo que no se estudió el efecto de los bloqueadores en dicha mutante.

Debido a la baja solubilidad del TTA-A2 en agua, en este caso se utilizó DMSO para disolver el TTA-A2, razón por la cual, en todos los experimentos las células fueron expuestas a la acción del DMSO (0.0015%) para restar cualquier posible bloqueo de los canales $Ca_v3.2$ debido a este disolvente (Fig. 17A, B y C). En promedio, el DMSO bloqueó el $13 \pm 2 \%$ ($n = 15$) de la corriente de calcio a -30 mV en los canales $Ca_v3.2$ silvestre, $8 \pm 4 \%$ ($n = 6$; no significativo) en la mutante Q1848R, mientras que este efecto se incrementó de manera significativa al $23 \pm 5 \%$ ($n = 8$; $P = 0.038$) en la mutante Q1848G.

El bloqueo por DMSO en diferentes canales ha sido ampliamente documentado y en nuestro laboratorio hemos observado un efecto entre el 10 y 15% de bloqueo de las corrientes de calcio de los canales Ca_v3 [66]. Independientemente del efecto del DMSO, los resultados de la Fig. 17 muestran que las mutantes Q1848R y Q1848G fueron estadísticamente menos sensibles al bloqueo por TTA-A2 con respecto al canal $Ca_v3.2$ silvestre. Los porcentajes de bloqueo respectivos fueron 54 ± 4 ($n = 15$); 14 ± 4 ($n = 6$) y 23 ± 3 ($n = 8$) para los canales $Ca_v3.2$ -WT, Q1848R y Q1848G, respectivamente (Fig. 17D). Estos resultados confirman que la glutamina Q1848 del canal $Ca_v3.2$ forma parte del sitio de unión del TTA-A2 en este canal, ya que la sustitución de dicho residuo por arginina o glicina disminuye significativamente la acción (interacción) del TTA-A2 con su sitio de unión. Además, este resultado indica que el sitio de unión al TTA-A2 descrito en los canales $Ca_v3.1$ [66] y $Ca_v3.3$ (Chávez-Colorado et al., en preparación), también se conserva en los canales $Ca_v3.2$. El siguiente paso, fue entonces investigar si el bloqueo de la amilorida era afectado por dichas mutaciones.

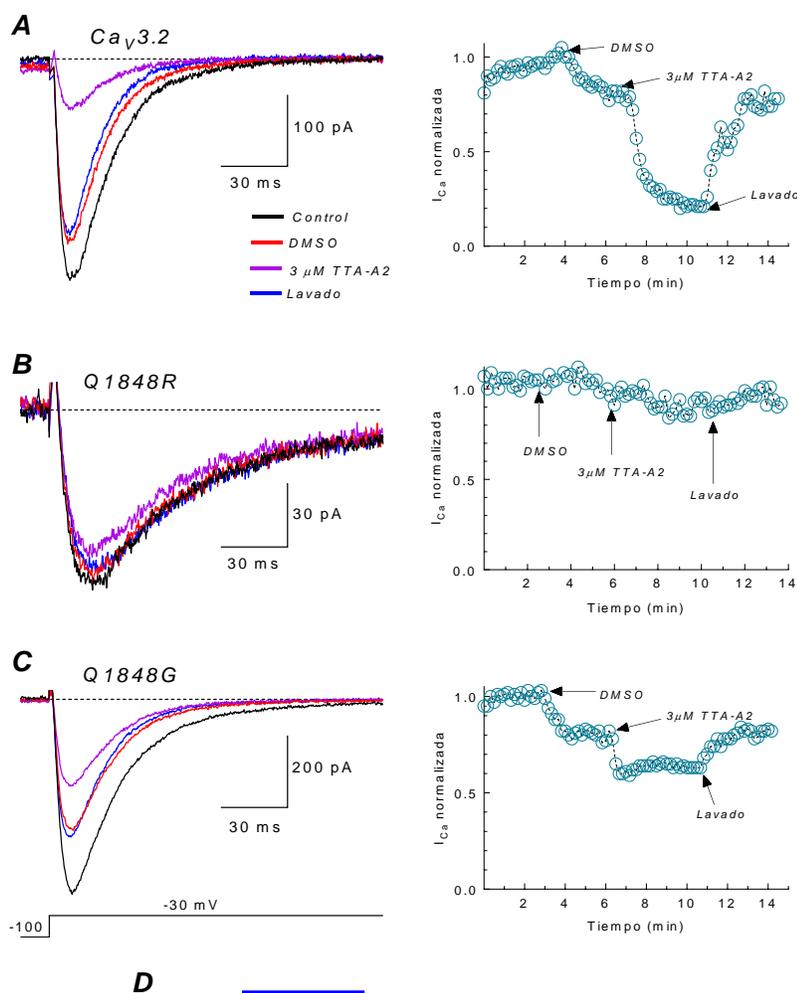


Figura 17. Efecto del TTA-A2 en los canales $Ca_v3.2$ silvestre y mutantes de la glutamina Q1848. A, B y C. Trazos representativos de corriente a -30 mV (paneles a la izquierda) y cursos temporales (paneles a la derecha) obtenidos de células HEK-293 transfectadas con los canales indicados en cada panel, en respuesta a las condiciones experimentales indicadas. El DMSO se agregó a una concentración final de 0.0015%, antes de exponer las células al fármaco TTA-A2 (3 μ M). La solución externa de registro contenía 10 mM de Ca^{2+} como acarreador de carga. En los gráficos del curso temporal, los valores de corriente fueron normalizados con respecto a la amplitud registrada justo antes de iniciar la perfusión de la cámara de registro con la solución que contiene el DMSO. D. Porcentaje de la inhibición de corriente de calcio en los canales $Ca_v3.2$ -WT y mutantes debida exclusivamente a la acción del TTA-A2. En cada célula el porcentaje de bloqueo debido al DMSO se restó del bloqueo obtenido en presencia del TTA-A2 disuelto en DMSO, de tal forma que solo se expresa el efecto del TTA-A2. Las barras muestran el promedio \pm el error estándar; y el número de células investigadas se indica entre paréntesis. En este caso la utilización de la prueba estadística t de Student ($P < 0.0001$) demostró que el bloqueo es significativamente menor en ambas mutantes con respecto al canal $Ca_v3.2$ silvestre.

7.5 Efecto de la amilorida sobre los canales $\text{Ca}_v3.2$ mutantes de Q1848.

El análisis de los resultados obtenidos con las mutantes de la glutamina Q1848 del canal $\text{Ca}_v3.2$ se presenta de manera resumida en la Fig. 18. En este caso la amilorida (100 μM) bloqueo con la misma potencia al canal silvestre y las mutantes Q1848G y Q1848R. Incluso el curso temporal con el que la amilorida disminuyó la amplitud de la corriente y la recuperación de ésta después de lavar el diurético del baño fueron muy similares en los tres canales estudiados. El valor promedio para el bloqueo de la corriente del canal silvestre fue de $74 \pm 3 \%$ ($n = 7$); el mismo valor para la mutante Q1848G 7 ($n = 4$) y $75 \pm 3 \%$ ($n = 5$) para la mutante Q1848R (Fig. 18D). Es de notarse que en la presente serie de experimentos el porcentaje de bloqueo ejercido por 100 μM de amilorida en el canal silvestre ($74 \pm 3 \%$; Fig. 18D) fue significativamente más alto al observado en los experimentos donde se evaluó la primera serie de mutantes del canal $\text{Ca}_v3.2$ ($55 \pm 2 \%$; Fig. 14). Una posible explicación pudiera ser la concentración del acarreador de carga presente en las soluciones externas de cada grupo de experimentos; por ejemplo, en los experimentos de la Fig. 14 se utilizó 5 mM de Ca^{2+} , mientras que para la Fig. 18 la solución externa contenía 10 mM del ion permeante. A la fecha no se ha estudiado el efecto de la concentración del acarreador de carga en el bloqueo de los canales tipo T por amilorida. Sin embargo, antagonistas con mayor afinidad como el mibefradil incrementan su potencia de bloqueo con concentraciones menores de Ca^{2+} en la solución externa de registro, probablemente debido a que el mibefradil compite por su sitio de unión con el ion permeante [90]. Por lo tanto, la observación de que el bloqueo por amilorida aumento directamente con la concentración del ion Ca^{2+} en nuestras soluciones externas, podría ser indicativo de que la amilorida no compite con el ion permeante por su sitio de unión. Independientemente del mecanismo involucrado en el bloqueo de la corriente de Ca^{2+} a través del poro del canal $\text{Ca}_v3.2$ por la amilorida, los resultados de la Fig. 18D demuestran que bajo las mismas condiciones experimentales de registro, los canales $\text{Ca}_v3.2$ y las mutantes Q1848G y Q1848R son igualmente sensibles al bloqueo por este diurético. En resumen, los resultados presentados en esta sección indican que el sitio de unión del TTA-A2 descrito previamente en el canal $\text{Ca}_v3.1$ y $\text{Ca}_v3.3$, se conserva en el canal $\text{Ca}_v3.2$ estudiado en la presente tesis. Asimismo, las evidencias experimentales sugieren que el sitio de unión de la amilorida en el canal $\text{Ca}_v3.2$ no incluye la glutamina 1848, residuo molecular de suma relevancia en la interacción del TTA-A2 con el canal $\text{Ca}_v3.2$.

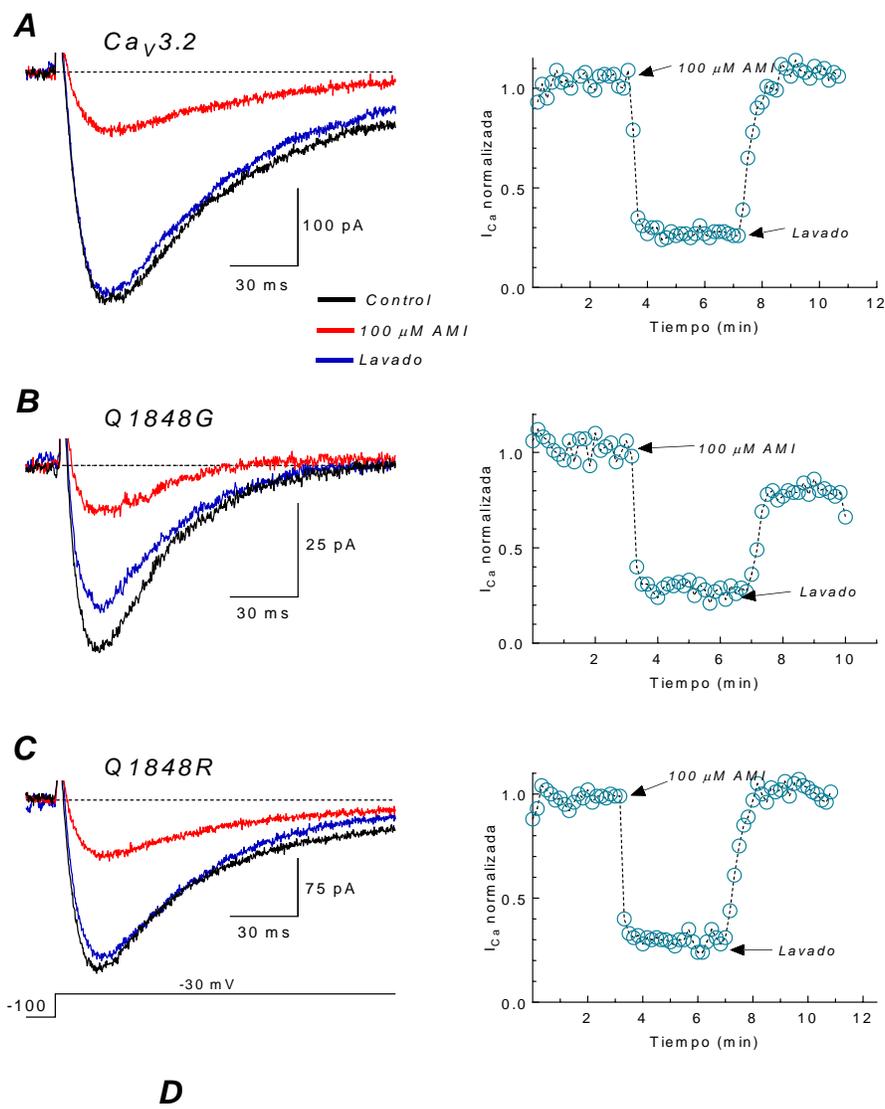


Figura 18. Bloqueo por la amilorida de los canales $Ca_v3.2$ silvestre y mutantes de la Q1848. Trazos representativos de corrientes de calcio registradas a -30mV en ausencia (Control), presencia (100 μM AMI) y después de la exposición a la amilorida (Lavado) obtenidas de células HEK-293 transfectadas con el canal $Ca_v3.2$ silvestre (A) y las mutantes Q1848G (B) y Q1848R (C). A la derecha de los trazos de corriente se muestran los cursos temporales del bloqueo para cada tipo de canal. La solución externa de registro contenía 10 mM de Ca^{+2} como acarreador de carga. D, Porcentaje de bloqueo de la corriente de calcio de los canales indicados por la presencia de 100 μM amilorida. Las barras muestran el promedio \pm el error estándar; y el número de células investigadas se indica entre paréntesis. Claramente, el porcentaje de bloqueo inducido por la amilorida fue el mismo en los tres tipos de canales.

8 DISCUSIÓN

8.1 El sitio de unión a la amilorida no incluye ninguno de los aminoácidos sugeridos por el *docking* en el modelo del canal Ca_v3.2 generado con base al canal KcsA.

Los aminoácidos propuestos por las simulaciones de *docking* de la amilorida con el modelo del canal Ca_v3.2 que se obtuvo por homología con el canal de potasio KcsA, parecen no formar parte del sitio de unión de la amilorida en este canal de calcio tipo T. No obstante que dos de las mutantes (S1836P y P1837T) presentaron diferencias significativas, aunque discretas (menores al 12%) en el porcentaje de bloqueo respecto al canal Ca_v3.2 silvestre (Fig. 14). La interpretación de estas observaciones como evidencia de una interacción del fármaco amilorida con la proteína del canal Ca_v3.2 no resulta ser una obviedad. Existen varios ejemplos en la literatura que indican que para que cualquier aminoácido que forme parte del sitio de unión a un antagonista, la mutación de éste por cualquier otro aminoácido, modificará de manera significativa la interacción con dicho antagonista [91-93], por lo tanto, el hecho de que otras mutaciones del mismo residuo (S1836A o P1837I, por ejemplo, Fig. 14) no haya modificado el bloqueo por amilorida, sugiere que la S1836 y la P1837 no forman parte del sitio de unión al diurético.

Las diferencias observadas en el porcentaje de bloqueo podrían explicarse por las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos que se sustituyeron. En primer lugar, la prolina es el único aminoácido que forma una cadena cíclica entre el átomo de nitrógeno de la cadena principal (*backbone*) del aminoácido y su cadena lateral; por lo tanto, la introducción de una prolina en lugar de la serina (mutante S1836P), distorsiona y quiebra las hélices alfa transmembranales, restringiendo los ángulos de torsión (φ , ψ) de la posición N. También destruye la continuidad de puentes de hidrógeno formados por el oxígeno del grupo carbonilo del aminoácido en la posición N-4 y el nitrógeno del grupo amida del aminoácido en la posición N [72]. Por lo tanto, los cambios estructurales que genera la introducción de una prolina en la proteína, podrían modificar la interacción de ésta con el fármaco y así modificar su sensibilidad al bloqueo. Por el contrario, cuando la serina se substituyo por la alanina (S1836A), aminoácido que conserva la estructura de hélice alfa, el bloqueo de la amilorida no se modificó significativamente respecto al observado en el canal Ca_v3.2 silvestre.

En el caso de la mutante P1837T, la explicación se puede asociar a que la treonina es un aminoácido que contiene un grupo hidroxilo en la cadena lateral que le confiere polaridad; por lo tanto, puede participar en la formación de puentes de hidrogeno a diferencia del aminoácido que se sustituyó (prolina). Además, su cadena lateral es más larga por un metilo que la de la serina y esto podría explicar porque la sustitución por serina no modificó el porcentaje de bloqueo, como si lo hizo la treonina (Fig. 14) [72]. En este caso, es probable que la mutación por alanina (la cual no se estudió en este trabajo) pueda proporcionar información más concluyente acerca de la contribución de la prolina al sitio de unión de la amilorida. Por lo anterior, los experimentos realizados en el presente trabajo de tesis sugieren que la disminución en la sensibilidad al bloqueo por amilorida en estas mutantes podría deberse en mayor medida al efecto ejercido por las propiedades intrínsecas de los aminoácidos prolina y treonina y no porque estos residuos formen parte del sitio de unión al fármaco amilorida.

8.2 Bloqueo de los canales mutantes de Ca_v3.1 por amilorida.

Como ya se ha mencionado, nuestro grupo de trabajo ya ha reportado el bloqueo del canal Ca_v3.1 inducido por el TTA-A2 [68]. En dicho estudio se identificó a la glutamina Q1805 como uno de los aminoácidos clave que forman el sitio de unión al fármaco (ver Antecedentes). Por lo tanto, debido a que la primera serie de mutaciones del canal Ca_v3.2 no arrojó indicios sobre el sitio de unión a la amilorida, se decidió investigar el efecto de la amilorida en las mutantes del canal Ca_v3.1, con la finalidad de saber si dicho sitio de unión también interaccionaba con este diurético. Aunque en términos de estructura, la molécula de amilorida no tiene mucha similitud con la molécula de TTA-A2 (Fig. 4A), la justificación para realizar este experimento es que la cavidad central del canal Ca_v3.1 donde se encuentra la glutamina 1805, se propone como posible sitio de unión a otros fármacos de estructuras diversas [68].

Los resultados obtenidos con las mutantes de Ca_v3.1 demostraron una disminución en la sensibilidad al bloqueo por 500 μM amilorida comparado con el canal Ca_v3.1 silvestre, en dos diferentes condiciones de registro, una utilizando 10 mM de Ca²⁺ como acarreador de carga (Fig. 15) y otra donde se aumentó al doble la concentración del ion permeante (Fig. 16). La justificación de utilizar una mayor concentración de Ca²⁺ como acarreador de carga, es que se

pueden obtener corrientes iónicas de una mayor amplitud y por lo tanto, mayor precisión en el análisis de los registros de corriente. De hecho, en esta última condición se obtuvo la diferencia más sustancial (y significativa) en el porcentaje de bloqueo por amilorida entre Q1805R (28%) y el canal silvestre (47%). Aunque esta disminución en la sensibilidad al bloqueo observada en la mutante Q1805R (40%) no es de la misma magnitud a la reportada para el TTA-A2 (70%) [68]; en este caso, dicho efecto si podría deberse a que la Q1805 forme parte del sitio de unión de amilorida en el canal $Ca_v3.1$.

En primer lugar, con base en las propiedades estructurales de la arginina (R) que posee la cadena lateral más larga entre todos los aminoácidos, es posible argumentar que la inserción de dicha cadena con la mutante Q1805R podría interferir con la ruta de acceso de amilorida hacia su sitio de unión en la cavidad central del canal $Ca_v3.1$. La diferencia en el bloqueo solo fue significativa para la mutante Q1805R, aunque en la Q1805S y Q1805P se observó la misma tendencia sin llegar a ser significativa, mientras que la mutante de alanina (Q1805A) presentó el mismo porcentaje de bloqueo que el canal $Ca_v3.1$ silvestre (Fig. 15). Este último resultado con la mutante de alanina es el que no permite concluir que la Q1805 forme parte del sitio de unión a la amilorida en el canal $Ca_v3.1$, ya que si así fuera, la disminución en el bloqueo debería de haberse observado inequívocamente en esta mutante, como se ha observado para el TTA-A2 y otros fármacos [68, 91, 93, 94].

En resumen, aunque no se haya encontrado el sitio de unión de amilorida en el canal $Ca_v3.1$, los resultados presentados aquí significan evidencias de que al menos un sitio de unión a la amilorida podría ubicarse en o en la vecindad de la cavidad central del canal $Ca_v3.1$. En un trabajo reciente, en un canal iónico sensible a iones hidronio (canales ASIC), se concluyó que la amilorida tiene varios sitios de unión en estos canales [95], por lo que es posible que la cavidad central del canal $Ca_v3.1$ sea uno de los varios sitios de unión a la amilorida en este canal. En este sentido, debido a las altas concentraciones de amilorida que se requiere para bloquear de manera significativa la corriente del canal $Ca_v3.1$ (al menos 5 veces más que para el canal $Ca_v3.2$; Fig. 15 y 16, respectivamente), la disminución en la sensibilidad observada con la mutante

Q1805R podría estar relacionada con un sitio de unión de baja afinidad comparado con el que pudiera estar presente en el canal $Ca_v3.2$ (véase más abajo).

8.3 El sitio de unión a la amilorida y el TTA-A2 en los canales de $Ca_v3.2$ no comparten la glutamina 1848.

Las mutantes del canal $Ca_v3.2$ en la posición Q1848 permitieron demostrar que el sitio de unión al TTA-A2 descrito previamente para el canal $Ca_v3.1$ [66] y $Ca_v3.3$ (datos no publicados) se conserva en el canal $Ca_v3.2$ (Fig. 17). Lo anterior sugiere que los canales de calcio tipo T: $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$, se caracterizan por poseer un sitio de unión a antagonistas de alta afinidad ubicado en la cavidad central del canal. En el canal $Ca_v3.1$ ya se reportó que dicho sitio de unión permite la interacción de compuestos análogos al TTA-A2, como el TTA-P2, mibefradil, y otros. Ahora habrá que investigar si el efecto de estos antagonistas también se ve afectado en la mutante Q1848R como fue el caso para el TTA-A2 (Fig. 17).

Por otro lado, las mutantes de la Q1848 también demostraron inequívocamente que el sitio de unión de la amilorida en el canal $Ca_v3.2$ no incluye la glutamina 1848, ya que ninguna de las mutantes de este residuo modificó la sensibilidad al bloqueo por el diurético en comparación con el canal silvestre (Fig. 18). Este resultado contrasta con lo observado con las mutantes de la glutamina 1805 del canal $Ca_v3.1$, las cuales mostraron una tendencia en algunos casos significativa a ser menos sensibles al bloqueo por amilorida (Fig. 15 y 16). Una posible explicación ya se planteó en el apartado anterior de esta discusión y tiene que ver con las concentraciones de amilorida requeridas para bloquear las corrientes de ambos canales. Nuestro propio grupo de investigación reportó previamente [96] que la IC_{50} de amilorida para bloquear las corrientes del canal $Ca_v3.2$ es 10 veces más pequeña que la de los otros dos miembros de la subfamilia de canales tipo T ($Ca_v3.1$ y $Ca_v3.3$). Es por ello, que al utilizar 500 μ M para bloquear las corrientes del canal $Ca_v3.1$ se facilite la unión inespecífica de la amilorida en varios sitios del canal $Ca_v3.1$, tal como se ha observado para el canal ASIC-1 [95], mientras que en el canal $Ca_v3.2$ al utilizar una concentración de 100 μ M, se reduciría la unión inespecífica de la amilorida en la cavidad central del canal, donde al parecer se restringe la interacción a solo aquellos compuestos

de mayor afinidad. Por ejemplo, el TTA-A2 se utilizó en todos los casos a una concentración de solo 3 μM , es decir, una potencia de bloqueo 30 veces más alta que la amilorida.

Tomando en consideración los resultados del presente trabajo de tesis, los reportados previamente por mi compañero Eduardo Chávez Colorado en el canal $\text{Ca}_v3.1$ y $\text{Ca}_v3.3$, así como los del canal ASIC-1 [95], es posible predecir que la amilorida interactúe con varias regiones moleculares de la proteína de los canales Ca_v3 , ya que al ser un bloqueador menos potente se reduce la posibilidad de contar con un sitio de unión de alta afinidad como es el caso de los compuestos similares al TTA-A2. Así, no obstante que el canal $\text{Ca}_v3.2$ es el más sensible al bloqueo por amilorida de los tres miembros de la subfamilia Ca_v3 , dicho efecto no parece ser mediado a través de la interacción del diurético con el sitio de unión de alta afinidad presente en la cavidad central de los canales Ca_v3 .

9 CONCLUSIONES

- Los residuos N287, S1836 y P1837 no forman parte del sitio unión a amilorida en el canal $Ca_v3.2$.
- La discreta, aunque significativa disminución en la sensibilidad al bloqueo por amilorida encontrada en las mutantes S1836P y P1837T es debida principalmente a los cambios fisicoquímicos inducidos por estos aminoácidos en la estructura de la proteína del canal y no a la modificación del sitio de unión a la amilorida *per se*.
- Es probable que el canal $Ca_v3.1$ contenga un sitio de unión de baja afinidad a la amilorida en la cavidad central, o en la cercanía de ésta.
- El bloqueo del canal $Ca_v3.2$ por amilorida no involucra la interacción con la glutamina 1848 que se localiza en la cavidad central del canal, por lo que el sitio de unión a este diurético no es el mismo al que se une con alta afinidad el TTA-A2 en los tres canales de la subfamilia Ca_v3 .
- Debido a su baja potencia de bloqueo, la amilorida podría estar ejerciendo su efecto inhibitorio de la corriente de calcio a través de la interacción con más de un sitio de unión en la proteína de los canales Ca_v3 .

10 REFERENCIAS

1. Alberts, B., *Biología molecular de la célula. Capítulo 5. "Transmisión de señales entre células"*. 5° ed. Vol. 1. 2010. 1728.
2. Teleisnik, S., *Receptores Celulares y la transducción de señales*. 1° edición ed. Biología celular ed. Encuentro. 2006, Córdoba. 268.
3. Hille, B., *Ion channels of excitable membranes*. 3rd ed. 2001, Sunderland, Mass.: Sinauer. xviii, 814 p.
4. Hodgkin, A.L. and A.F. Huxley, *Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo*. J Physiol, 1952. **116**(4): p. 449-72.
5. Hodgkin, A.L. and A.F. Huxley, *A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve*. J Physiol, 1952. **117**(4): p. 500-44.
6. Hodgkin, A.L. and A.F. Huxley, *The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo*. J Physiol, 1952. **116**(4): p. 473-96.
7. Hodgkin, A.L. and A.F. Huxley, *The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo*. J Physiol, 1952. **116**(4): p. 497-506.
8. Hodgkin, A.L., A.F. Huxley, and B. Katz, *Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo*. J Physiol, 1952. **116**(4): p. 424-48.
9. Conti-Tronconi, B.M. and M.A. Raftery, *The nicotinic cholinergic receptor: correlation of molecular structure with functional properties*. Annu Rev Biochem, 1982. **51**: p. 491-530.
10. Noda, M., et al., *Cloning and sequence analysis of calf cDNA and human genomic DNA encoding alpha-subunit precursor of muscle acetylcholine receptor*. Nature, 1983. **305**(5937): p. 818-23.
11. Noda, M., et al., *Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence*. Nature, 1984. **312**(5990): p. 121-7.
12. Tanabe, T., et al., *Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle*. Nature, 1987. **328**(6128): p. 313-8.
13. Lipscombe, D., *Ion Channels*. Encyclopedia of Life Sciences, 2001: p. 1-9.
14. Gomora, J.C.F.d.M., F., *Canales iónicos*, in *Biología funcional de los Animales*, F. M, Editor. 2009: México. p. 40-85.
15. Alexander, S.P.H., et al., *The Concise Guide to Pharmacology 2015/16: Voltage-Gated Ion Channels*. British Journal of Pharmacology, 2015. **172**(24): p. 5904-5941.
16. Darszon, A., et al., *T-type Ca²⁺ channels in sperm function*. Cell Calcium, 2006. **40**(2): p. 241-252.
17. Besson, P., et al., *How do voltage-gated sodium channels enhance migration and invasiveness in cancer cells?* Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 2015. **1848**(10): p. 2493-2501.
18. Fraser, S.P. and L.A. Pardo, *Ion channels: functional expression and therapeutic potential in cancer. Colloquium on Ion Channels and Cancer*. EMBO Rep, 2008. **9**(6): p. 512-5.
19. Lumpkin, E.A., K.L. Marshall, and A.M. Nelson, *The cell biology of touch*. J Cell Biol, 2010. **191**(2): p. 237-48.
20. Berridge, M.J., M.D. Bootman, and H.L. Roderick, *Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(7): p. 517-29.
21. Catterall, W.A., *Voltage-Gated Calcium Channels*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2011. **3**(8).
22. Mariot, P., et al., *Overexpression of an alpha(1H) (Ca(v)3.2) T-type calcium channel during neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(13): p. 10824-10833.
23. Catterall, W.A., *Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels*. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2000. **16**: p. 521-555.

24. Catterall, W.A., et al., *Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins*. Toxicon, 2007. **49**(2): p. 124-141.
25. Dolphin, A.C., *Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology*. Journal of Physiology-London, 2016. **594**(19): p. 5369-5390.
26. Dolphin, A.C., et al., *The effect of alpha2-delta and other accessory subunits on expression and properties of the calcium channel alpha1G*. J Physiol, 1999. **519 Pt 1**: p. 35-45.
27. Dubel, S.J., et al., *Plasma membrane expression of T-type calcium channel alpha(1) subunits is modulated by high voltage-activated auxiliary subunits*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(28): p. 29263-29269.
28. Hansen, J.P., et al., *Calcium channel gamma 6 subunits are unique modulators of low voltage-activated (Cav3.1) calcium current*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2004. **37**(6): p. 1147-1158.
29. Arteaga, R., *Papel del triptófano en la región AID de los canales de calcio HVA en la modulación del canal de calcio alfa1G por subunidades beta*, in Facultad de Ciencias. 2007, UNAM: México.
30. Klugbauer, N., et al., *Molecular diversity of the calcium channel alpha2delta subunit*. J Neurosci, 1999. **19**(2): p. 684-91.
31. Walsh, C.P., et al., *Three-dimensional structure of CaV3.1: comparison with the cardiac L-type voltage-gated calcium channel monomer architecture*. J Biol Chem, 2009. **284**(33): p. 22310-21.
32. Davies, A., et al., *The calcium channel alpha(2)delta-2 subunit partitions with Ca(V)2.1 into lipid rafts in cerebellum: Implications for localization and function*. Journal of Neuroscience, 2006. **26**(34): p. 8748-8757.
33. Davies, A., et al., *The alpha(2)delta subunits of voltage-gated calcium channels form GPI-anchored proteins, a posttranslational modification essential for function*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(4): p. 1654-1659.
34. Davies, A., et al., *Functional biology of the alpha(2)delta subunits of voltage-gated calcium channels*. Trends Pharmacol Sci, 2007. **28**(5): p. 220-8.
35. Bauer, C.S., et al., *A new look at calcium channel alpha2delta subunits*. Curr Opin Neurobiol, 2010. **20**(5): p. 563-71.
36. Letts, V.A., et al., *The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca2+-channel gamma subunit*. Nat Genet, 1998. **19**(4): p. 340-7.
37. Arikath, J. and K.P. Campbell, *Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex*. Curr Opin Neurobiol, 2003. **13**(3): p. 298-307.
38. Arikath, J., et al., *Gamma 1 subunit interactions within the skeletal muscle L-type voltage-gated calcium channels*. J Biol Chem, 2003. **278**(2): p. 1212-9.
39. Kang, M.G. and K.P. Campbell, *Gamma subunit of voltage-activated calcium channels*. J Biol Chem, 2003. **278**(24): p. 21315-8.
40. Randall, A. and C.D. Benham, *Recent advances in the molecular understanding of voltage-gated Ca2+ channels*. Mol Cell Neurosci, 1999. **14**(4-5): p. 255-72.
41. Nilius, B., et al., *A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells*. Nature, 1985. **316**(6027): p. 443-6.
42. Olivera, B.M., et al., *Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins*. Annu Rev Biochem, 1994. **63**: p. 823-67.
43. Randall, A. and R.W. Tsien, *Pharmacological dissection of multiple types of Ca2+ channel currents in rat cerebellar granule neurons*. J Neurosci, 1995. **15**(4): p. 2995-3012.
44. Bourinet, E., et al., *Splicing of alpha 1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels*. Nat Neurosci, 1999. **2**(5): p. 407-15.
45. Hille, B., *Local-Anesthetics - Hydrophilic and Hydrophobic Pathways for Drug-Receptor Reaction*. Journal of General Physiology, 1977. **69**(4): p. 497-515.

46. Catterall, W.A., *Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000. **16**: p. 521-55.
47. Serrano, J.R., E. Perez-Reyes, and S.W. Jones, *State-dependent inactivation of the alpha 1G T-type calcium channel*. *Journal of General Physiology*, 1999. **114**(2): p. 185-201.
48. George, A.L., Jr., *Inherited disorders of voltage-gated sodium channels*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(8): p. 1990-9.
49. Sariban-Sohraby, S. and D.J. Benos, *The amiloride-sensitive sodium channel*. *Am J Physiol*, 1986. **250**(2 Pt 1): p. C175-90.
50. Bicking, J.B., Mason, J. W., Woltersdorf, O. W., Jones, J. H., Kwong, S. F., Robb, C. M. and Cragoe, E. J., *Pyrazine Diuretics. I. N-Amidino-3-amino-6-halopyrazinecarboxamides*. *J Med Chem*, 1965. **8**((5)): p. 638-642.
51. Benos, D.J., *Amiloride: a molecular probe of sodium transport in tissues and cells*. *Am J Physiol*, 1982. **242**(3): p. C131-45.
52. Eaton, D.C. and K.L. Hamilton, *The amiloride-blockable sodium channel of epithelial tissue*. *Ion Channels*, 1988. **1**: p. 251-82.
53. Tang, C.M., F. Presser, and M. Morad, *Amiloride selectively blocks the low threshold (T) calcium channel*. *Science*, 1988. **240**(4849): p. 213-5.
54. Todorovic, S.M. and C.J. Lingle, *Pharmacological properties of T-type Ca²⁺ current in adult rat sensory neurons: effects of anticonvulsant and anesthetic agents*. *J Neurophysiol*, 1998. **79**(1): p. 240-52.
55. Lopez-Charcas, O., M. Rivera, and J.C. Gomora, *Block of Human CaV3 Channels by the Diuretic Amiloride*. *Mol Pharmacol*, 2012.
56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/?term=amiloride>.
57. Zhou, Y., et al., *Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution*. *Nature*, 2001. **414**(6859): p. 43-8.
58. Rivera, M., O. Lopez-Charcas, and J.C. Gomora, *Amiloride Docking to T-Type Calcium Channels*. *Biophysical Journal*, 2011. **100**(3): p. 568-568.
59. Balderas, E., et al., *Niflumic acid blocks native and recombinant T-type channels*. *J Cell Physiol*, 2012. **227**(6): p. 2542-55.
60. Payandeh, J., et al., *Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states*. *Nature*, 2012. **486**(7401): p. 135-U166.
61. Tang, L., et al., *Structural basis for Ca²⁺ selectivity of a voltage-gated calcium channel*. *Nature*, 2014. **505**(7481): p. 56-61.
62. Uebele, V.N., et al., *Positive allosteric interaction of structurally diverse T-type calcium channel antagonists*. *Cell Biochem Biophys*, 2009. **55**(2): p. 81-93.
63. Egan, M.F., et al., *Randomized controlled study of the T-type calcium channel antagonist MK-8998 for the treatment of acute psychosis in patients with schizophrenia*. *Hum Psychopharmacol*, 2013. **28**(2): p. 124-33.
64. Uslaner, J.M., et al., *T-Type Calcium Channel Antagonism Decreases Motivation for Nicotine and Blocks Nicotine- and Cue-Induced Reinstatement for a Response Previously Reinforced with Nicotine*. *Biological Psychiatry*, 2010. **68**(8): p. 712-718.
65. Uslaner, J.M., et al., *T-type calcium channel antagonism produces antipsychotic-like effects and reduces stimulant-induced glutamate release in the nucleus accumbens of rats*. *Neuropharmacology*, 2012. **62**(3): p. 1413-21.
66. Chavez-Colorado, E., *Bases moleculares en la interacción del bloqueador TTA-A2 en el canal CaV3.1*. 2015, Universidad Nacional Autónoma de México. p. 99.
67. Payandeh, J., et al., *The crystal structure of a voltage-gated sodium channel*. *Nature*, 2011. **475**(7356): p. 353-8.

68. Colorado, E.C., *Bases moleculares en la interacción del bloqueador TTA-A2 en el canal Ca_v 3.1*, in *Neuropatología Molecular*. 2015, UNAM: México. p. 104.
69. Pestko, A.G.a.R.D., *Protein Structure and Function*. 2004, London: New Science Press Ltd. 1|79.
70. Morrison, K.L. and G.A. Weiss, *Combinatorial alanine-scanning*. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2001. **5**(3): p. 302-307.
71. Arias, O., II, et al., *Characterization of the gating brake in the I-II loop of Ca(v)3.2 T-type Ca(2+) channels*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(13): p. 8136-44.
72. Petsko, G.A.R., D., *Protein structure and function*. 1a ed. 2004, Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc.
73. Cordes, F.S., J.N. Bright, and M.S. Sansom, *Proline-induced distortions of transmembrane helices*. *J Mol Biol*, 2002. **323**(5): p. 951-60.
74. Yohannan, S., et al., *Proline substitutions are not easily accommodated in a membrane protein*. *J Mol Biol*, 2004. **341**(1): p. 1-6.
75. Ayoola, C., et al., *Inhibition of CaV3.2 T-type calcium channels in peripheral sensory neurons contributes to analgesic properties of epipregnanolone*. *Psychopharmacology (Berl)*, 2014. **231**(17): p. 3503-15.
76. Coutelier, M., et al., *A Recurrent Mutation in CACNA1G Alters Cav3.1 T-Type Calcium-Channel Conduction and Causes Autosomal-Dominant Cerebellar Ataxia*. *American Journal of Human Genetics*, 2015. **97**(5): p. 726-737.
77. Eckle, V.S., et al., *Mechanisms by which a CACNA1H mutation in epilepsy patients increases seizure susceptibility*. *J Physiol*, 2014. **592**(4): p. 795-809.
78. Lu, A.T., et al., *Support for calcium channel gene defects in autism spectrum disorders*. *Mol Autism*, 2012. **3**(1): p. 18.
79. Gangarossa, G., et al., *T-type calcium channel Cav3.2 deficient mice show elevated anxiety, impaired memory and reduced sensitivity to psychostimulants*. *Front Behav Neurosci*, 2014. **8**: p. 92.
80. Weaver, E.M., et al., *Regulation of T-type calcium channel expression by sodium butyrate in prostate cancer cells*. *Eur J Pharmacol*, 2015. **749**: p. 20-31.
81. Ho, S.N., et al., *Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction*. *Gene*, 1989. **77**(1): p. 51-9.
82. Sambrook, J.R., D., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3° ed. Cloning and Transformation with Plasmid 2001.
83. Cribbs, L.L., et al., *Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca2+ channel gene family*. *Circ Res*, 1998. **83**(1): p. 103-9.
84. Horn, R. and S.J. Korn, *Prevention of rundown in electrophysiological recording*. *Methods Enzymol*, 1992. **207**: p. 149-55.
85. Hamill, O.P., et al., *Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches*. *Pflugers Arch*, 1981. **391**(2): p. 85-100.
86. Marty, A., Neher, E., *Tight-seal whole-cell recording*, in *Single channel recording*, B. Sakmann, Neher, E., Editor. 1995, Plenum Press: New York.
87. López-Charcas, O., *Efecto del fármaco amilorida sobre las propiedades biofísicas de los canales de calcio tipo T clonados de humano*, in *Facultad de Química*. 2011, Universidad Nacional Autónoma de México: México. p. 86.
88. Chavez-Colorado, E., Z. Herrera-Carrillo, and J.C. Gomora, *Blocking of T-Type Calcium Channels by TTA-A2 Reveals a Conservative Binding Site for State-Dependent Antagonists*. *Biophysical Journal*, 2016. **110**(3): p. 439a-440a.
89. Avila, L., S.G., *Contribución de las glicinas de los segmentos transmembranales IS6 IIS6 al mecanismo de activación de los canales Ca_v 3.1*, in *Neuropatología molecular*. 2015, UNAM: UNAM. p. 71.

90. Martin, R.L., et al., *Mibefradil block of cloned T-type calcium channels*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2000. **295**(1): p. 302-308.
91. Hockerman, G.H., et al., *Molecular Determinants of High-Affinity Phenylalkylamine Block of L-Type Calcium Channels*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(38): p. 22119-22122.
92. Lee, B.C., et al., *Localization of a Site of Action for Benzofuroindole-Induced Potentiation of BKCa Channels*. Molecular Pharmacology, 2012. **82**(2): p. 143-155.
93. Tang, L., et al., *Structural basis for inhibition of a voltage-gated Ca²⁺ channel by Ca²⁺ antagonist drugs*. Nature, 2016. **537**(7618): p. 117-121.
94. Hockerman, G.H., T. Scheuer, and W.A. Catterall, *Molecular determinants of diltiazem block in domains III_{S6} and IV_{S6} of L-type Ca²⁺ channels*. Biophysical Journal, 1999. **76**(1): p. A342-A342.
95. Qadri, Y.J., et al., *Amiloride docking to acid-sensing ion channel-1*. J Biol Chem, 2010. **285**(13): p. 9627-35.
96. Lopez-Charcas, O., M. Rivera, and J.C. Gomora, *Block of Human Ca(V)₃ Channels by the Diuretic Amiloride*. Molecular Pharmacology, 2012. **82**(4): p. 658-667.