



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SIMULADORES DEL CANAL TIPO-M EN LA
CONVULSIÓN NEONATAL FAMILIAR BENIGNA

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:
RUTH MORENO HERNÁNDEZ

DIRECTOR: DR. ARTURO REYES LAZALDE



JULIO 2018

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Interactiva de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla bajo la tutela del Dr. Arturo Reyes Lazalde.

AGRADECIMIENTOS

“La gratitud es la flor que brota del alma” Henry Ward Beeche

Ella bajó su rostro, se postró en tierra y le dijo: ¿Por qué he hallado gracia ante tus ojos para que te fijas en mí, siendo yo extranjera? Rut 2:10. Gracias Dios mío por todo lo que me has dado.

Gracias por la hermosa familia que me has dado. Gracias porque siempre que estoy angustiada y triste he encontrado paz y consuelo en tu palabra. Gracias por permitirme concluir mis estudios y darme cada día una nueva oportunidad de crecer.

Gracias a mi familia, empezando por mi padre y mis hermanas que han estado a mi lado desde que nací, ayudándome y apoyándome siempre, todas mis hermanas y hermanos son especiales para mí, sin embargo, quisiera dar especialmente muchas gracias a mi hermana Rosa Moreno Hernández has sido mi principal apoyo, una amiga, una hermana, un consuelo, una maestra, e inclusive una madre, gracias por todos tus consejos, tus regaños, tus lecciones, por enseñarme a ser una mujer de bien.

Quisiera agradecer a mi esposo Elias Ramos Sánchez, has cambiado mi vida y siempre para bien, contigo puedo ser yo misma, haces que me sienta muy tranquila, me has brindado tu apoyo incondicional, te has convertido en mi mejor amigo, siempre escuchándome, aconsejándome, soportándome y algunas veces regañándome pero sobre todo entendiéndome, me has dado la felicidad de ser madre de nuestro primer hijo iniciando así nuestra familia, aun nos faltan muchos proyectos a futuro y solo pido a Dios que me preste vida para seguir compartiéndola contigo.

Agradezco a mis amigas Claudia Isabel Barranco Palma y Abigail Juárez Sánchez quienes han estado conmigo desde el inicio de la universidad y siempre me han apoyado quiero que sepan que las valoro y quiero mucho.

Gracias a cada uno de mis profesores, desde mi infancia cada uno de ustedes ha sido especial para mí porque de una u otra forma siempre me han apoyado y alentado a seguir adelante confiando en que puedo lograr cualquier cosa si así me lo propongo. Gracias a todos ustedes. Gracias especialmente al Dr. Arturo Reyes Lazalde y la Dra. María Eugenia Pérez Bonilla por entenderme, alentarme y guiarme a dar el último paso para terminar mi carrera profesional.

¡Muchas gracias!

DEDICATORIA

A mi madre, porque no hay un solo día en que no me pregunte como seria nuestra vida si estuvieras con nosotros.

A mi padre Roberto Moreno que siempre nos ha alentado a ser mejores personas, a mis hermanos que me han apoyado hasta este día, especialmente mis hermanas Sharon, Alhelí y Rosa,

A mi hijo Elias Alexander, tu nacimiento me ha dado una gran alegría y fortaleza para seguir adelante pase lo que pase. Siempre por ti.

A mi esposo Elias Ramos, desde el día de nuestra boda hasta que la muerte nos separe, en las buenas y en las malas, salud y enfermedad, en la prosperidad y la adversidad. Siempre juntos.

ÍNDICE

Tabla de abreviaturas	3
RESUMEN	8
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1 Aspectos históricos	10
1.2 Síndromes epilépticos y su genética	11
1.2.1 Convulsiones Neonatales Familiares Benignas	12
1.3 Localización de los canales tipo-M en el cerebro	13
1.3.1 Localización de los canales tipo-M en la neurona	14
1.4 Función de los canales de K ⁺ tipo-M	15
1.5 Familia de genes que codifican canales de K ⁺	18
1.5.1 Estructura molecular de los canales de K ⁺ dependientes de voltaje	19
1.5.2 Canales de K ⁺ tipo-M y su relación con segundos mensajeros	20
1.6 Estructura de los receptores de acetilcolina tipo muscarínico	21
1.7 Estructura del canal de K ⁺ tipo-M	23
1.7.1 Inhibición del canal tipo-M	24
1.7.2 Corriente iónica tipo-M y la electrofisiología de los canales de K ⁺ tipo-M	27
1.8 Canalopatías epilépticas	32
1.8.1 Mutaciones de los canales de K ⁺ tipo-M (KCNQ)	34
1.9 Los modelos matemáticos en las corrientes iónicas	36
2. ANTECEDENTES	37
2.1 Simuladores de la corriente de potasio tipo-M en la Internet	37
3. JUSTIFICACIÓN	37
4. OBJETIVO GENERAL	38
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
6. MATERIAL Y MÉTODO	38
7. RESULTADOS	43
7.1 Módulo de lecciones	43
7.2 Módulo de simuladores	52
7.2.1 Simulador “CONVULSIONAR-M”	53
7.2.2 Simulador “SEÑALIZAR-M”	57

7.2.3 Simulador “REGISTRAR-M”	60
8. DISCUSIÓN	62
9. CONCLUSIONES	63
10. BIBLIOGRAFÍA	64

Tabla de abreviaturas

μm: microlitros

2P/4TM: con dos poros y cuatro dominios transmembrana

2TM/1P: con un poro y dos dominios transmembrana

4TM/2P: con dos poros y cuatro dominios transmembrana

6TM/1P: con un poro y seis dominios transmembrana

7-TM: con siete dominios transmembrana

AA: ácido araquidónico

Ach: Acetilcolina

AD: autosómica dominante

AKAP79/150: proteína ancorin kinasa-A 79/150.

AMPc: Adenosin monofosfato cíclico

AO: núcleo olfatorio anterior,

AR: autosómica recesiva

Ba²⁺: ion bario

BFNS: siglas en ingles de CNFB

C: capacitancia

Ca⁺⁺: ion calcio

CA1: Región del hipocampo (Cuerno de Amón 1)

CHRNA3: receptor colinérgico nicotínico subunidad alfa 3

CHRNA4: receptor colinérgico nicotínico subunidad alfa 4

CHRNA2: receptor colinérgico nicotínico subunidad beta 2

CNBF: convulsión neonatal familiar benigna

COOH: grupo carboxilo

Cpu: núcleo caudado putamen

Cx: neocorteza

DAG: diacilglicerol

EADNFL: Epilepsia frontal nocturna AD

EGCF+: Epilepsia generalizada con CF plus

EGI: epilepsia generalizada idiopática

ER: Retículo endoplasmático

Fr: corteza olfatoria frontal

GABA: Acido gama amino-butírico

GABRG2: subunidad Gama2 del receptor tipo A de ácido gama amino-butírico

gK: conductancia de potasio

gL: conductancia de fuga

GM: conductancia del canal tipo-M

$\hat{G}M$: conductancia máxima

gNa: conductancia de sodio

GPCRs: receptores acoplados a proteínas G

G_{q/11}: subunidad q ó q/11 de la proteína G

Gr: capa granular cerebelar;

HERG: homólogo de *Drosophila ether-a-go-go*

HGNC: Comité de nomenclatura de genes de HUGO

HUGO: Organización del genoma humano

I(VH): voltaje de sujeción

I: corriente aplicada

I_{AHP}: corriente mediada por calcio

I_{Cm}: corriente en el capacitor

I_K: corriente de K

I_L : corriente de fuga

I_M : Corriente muscarínica

I_{Na^+} : corriente de Na

IP_3 : inositol trifosfato

$I_{ss}(V)$: el paso de corriente desde su estado estable

I_T : corriente total

IUPHAR: Unión internacional de farmacología

K^+ : ion potasio

K_2P : Canales de K^+ con dos poros.

KCN: Canales de potasio gatillados por voltaje

KCNA1: canales de potasio gatillados por voltaje subfamilia A miembro 1

KCNQ: Canales de potasio gatillados por voltaje de la subfamilia Q

KCNQ2: Canal de potasio gatillado por voltaje de la subfamilia Q miembro 2

KCNQ3: Canal de potasio gatillado por voltaje de la subfamilia Q miembro 3

K_{ir} : canales rectificadores entrantes

K_v : Canales de potasio

K_v5 : canales KCNF

K_v9 : canales KCNS

LPA: ácido lisofosfatídico

LSD: núcleo septal lateral

m , n y h : compuertas de apertura e inactivación

Maxi K; SK; IK: grupo de canales selectivos al K^+ se clasifican de acuerdo a sus conductancias; Maxi K (conductancia grande), SK (conductancia intermedia), IK (conductancia pequeña).

mRNA: RNA mensajero

ms: milisegundos

mV: milivoltios

nA: nanoamperes

Na⁺: ion sodio

NH₂: grupo amino

Nicot alfa 3: alfa 3 nicotínicos

Nicot alfa 4: alfa 4 nicotínicos

Nicot beta 2: beta 2 nicotínicos

PA: ácido fosfático

pA: picoamperes

PA: potencial de acción

PI(4,5) P2: fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

PKA: Proteína cinasa A

PLC: fosfolipasa C

P-loop: bucle de poro

PM: potencial de membrana

Proteína G_i: inhibe adenilato ciclasa

Proteína G_s: estimula adenilato ciclasa

Proteínas G_q: estimula PLC

Receptor M1: receptor muscarínico de tipo 1

RF: formación reticular;

RI: resistencia de fuga

SCN1A: canal de sodio gatillado por voltaje subunidad 1 alfa

SCN1B: canal de sodio gatillado por voltaje subunidad 1beta

Shaker, Shaw, Shab, Shal: son canales homólogos de *Drosophila shaker*

SNC: sistema nervioso central

SNP: sistema nervioso periférico

SV2A: proteína de la vesícula sináptica 2 isoforma A

Th: tálamo.

TOK1, TWIK-1, TREK-1, TASK: superfamilias de canales de K^+ con dos poros y ocho segmentos transmembrana.

TTX: tetrodotoxina

V: voltaje

V^o : es el potencial de membrana para la mitad de los canales en estado abierto

V-D $\alpha 1$: subunidad alfa 1 voltaje dependiente

V-D $\beta 1$: subunidad beta 1 voltaje dependiente

V-D: voltaje dependiente

VH: diferencia del voltaje

VK: potencial de inversión del potasio

VL: potencial de inversión de fuga

VM: potencial de equilibrio para la corriente M

VM: voltaje de equilibrio

VNa: potencial de inversión del sodio

Z: valencia aparente del sensor de voltaje

α_m : constante de velocidad de apertura del canal

β_m : constante de velocidad de cierre del canal

RESUMEN

Las técnicas de registro intracelular, de fijación de voltaje y de biología molecular, han puesto al descubierto la implicación de las corrientes iónicas (aumento, disminución o anulación funcional) debidas a mutaciones en la secuencia génica de los canales iónicos. Es el caso de la corriente de K^+ tipo-M (I_M). Con una mutación en el canal, la corriente iónica disminuye o incluso desaparece. En consecuencia, la excitabilidad neuronal aumenta, ocasionando la enfermedad conocida como convulsión neonatal familiar benigna (CNFB). Este trabajo se realizó con el objetivo de reproducir computacionalmente la actividad electrofisiológica del canal de K^+ tipo-M. El programa fue desarrollado en Visual Basic versión 6.0 para ambiente Windows®. Para el leccionario se elaboraron imágenes 2D a mano alzada. Para la elaboración de los simuladores computacionales se utilizó el modelo matemático de Hodgkin y Huxley (1952), las ecuaciones se resolvieron computacional y simultáneamente por métodos numéricos. El programa se compiló en formato ejecutable, que puede ser abierto directamente desde Windows®. Se diseñó y desarrolló la primera versión del programa computacional interactivo titulado “Convulsionar-CNFB”, que consta de dos partes, una informacional y los simuladores. El menú principal del programa consta de tres secciones: un leccionario infográfico, los modelos utilizados y los simuladores interactivos. El leccionario incluye ocho tópicos: Síndromes epilépticos, CNFB, Producción de CNFB, canalopatías epilépticas, canales de potasio, canales de potasio tipo M, mutaciones de los canales KCNQ2-KCNQ3 y corriente tipo M. En la sección de modelos se detalla el modelo matemático de Hodgkin y Huxley (1952) con el desarrollo respectivo de las ecuaciones, el modelo bioeléctrico de la neurona, considerando cuatro corrientes: la de sodio, potasio, “M” y de fuga. El sub-menú de los simuladores consta de tres simuladores (1) El simulador “Convulsionar-M”, que permite reproducir los experimentos de fijación de corriente para observar el efecto que tiene I_M en el control de la excitabilidad neuronal; (2) El simulador “Señalizar-M” que sirve para observar la señal generada a partir de la unión de un ligando con el receptor metabotrópico de tipo muscarínico; (3) El simulador “Registrar-M” que simula la activación de la I_M con la

técnica de fijación de voltaje. El usuario tiene la posibilidad de realizar un número ilimitado de ensayos que le facilitarán la comprensión del funcionamiento del canal asociado a receptor; así como la cascada de vías de señalización que pueden modificar el funcionamiento del canal. La importancia del canal tipo-M es la regulación de la excitabilidad neuronal, cuya alteración puede ocasionar patologías como la CNFB.

1. INTRODUCCIÓN

La biofísica es una ciencia transdisciplinaria; en ella convergen conocimientos de biología, medicina, física, matemáticas, computación, química y electrónica. Su temática suele ser complicada para la mayoría de los alumnos y por esta razón se llega a cuestionar su utilidad en la vida diaria o incluso en la profesional, sin embargo la biofísica se puede describir como la ciencia que se ocupa del funcionamiento físico de los organismos vivos (Hladik, 1982). En esta tesis se presenta el análisis de la actividad electrofisiológica del canal de K^+ tipo-M y su relación con el síndrome de convulsiones neonatales familiares benignas, que es uno de los trastornos epilépticos (Zimprich et al., 2006).

1.1 Aspectos históricos

En 1941, Antoni describió una forma hereditaria de convulsiones neonatales que remitían después del desarrollo neurológico (Antoni, 1941). Rett y Teubel fueron los primeros en describir el síndrome familiar (Rett y Teubel, 1964). Las convulsiones neonatales familiares benignas (CNFB), se incluyeron desde 1989, en las clasificaciones de epilepsia y en los síndromes epilépticos. Leppert et al. (1989) mapearon el primer gen de CNFB en el brazo largo del cromosoma 20; un segundo locus fue identificado en el cromosoma 8. Una década después, se identificaron dos genes (KCNQ2 y KCNQ3) en CNFB (Singh et al., 1998; Charlier et al., 1998). Desde entonces, se han realizado grandes avances en la comprensión de las consecuencias biológicas de la mutación de genes involucrados en las epilepsias humanas de tipo genético.

La corriente tipo-M (I_M) fue descrita por primera vez en 1980 por Brown y Adams en neuronas de vertebrados, en ese mismo año los mismos autores descubrieron el efecto inhibidor de la muscarina en la corriente tipo-M. Posteriormente en 1982 se describió esta corriente en neuronas del sistema nervioso central (Halliwell y Adams 1982).

1.2 Síndromes epilépticos y su genética

Los trastornos epilépticos afectan a unos 20 a 40 millones de personas en todo el mundo, el 40% de estas son epilepsias generalizadas idiopáticas (EGI). La mayoría de las EGI que se heredan son enfermedades complejas y multigénicas (Charlier et al., 1998).

Existen diferentes tipos de epilepsias y convulsiones que son autosómicas dominantes, por ejemplo: (1) la epilepsia mioclónica juvenil, (2) convulsión neonatal familiar benigna, (3) convulsiones febriles, (4) epilepsia parcial con síntomas auditivos y (5) epilepsia nocturna del lóbulo frontal.

Cada uno de estos síndromes está asociado a una alteración de algún cromosoma. Específicamente, en las convulsiones neonatales familiares benignas están dañados los cromosomas 20q y 8q (Tabla 1). En este padecimiento, los genes alterados son: KCNQ2 y KCNQ3 que forman canales iónicos. Los canales iónicos afectados son canales de K⁺ dependientes de voltaje y del tiempo, canales tipo-M.

SÍNDROMES EPILEPTICOS IDIOPÁTICOS		
Síndrome epiléptico	Tipo de herencia	Cromosoma
Epilepsia mioclónica juvenil	AD	6p
Convulsión neonatal familiar benigna	AD	20q y 8q
Convulsiones febriles	AD	8q13-21 y 19p
Epilepsia parcial con síntomas auditivos	AD	10p
Epilepsia nocturna del lóbulo frontal	AD	20p
Epilepsia mioclónica progresiva	AR	21q22.3
Enfermedad de Lafora	AR	6p24
Lipofucinosis ceroides tipo juvenil	AR	16p

Tabla 1. Genes relacionados con síndromes epilépticos. En el caso de la convulsión neonatal familiar benigna, los genes afectados son KCNQ2 y KCNQ3, localizados en los cromosomas 20q y 8q. (AD) autosómica dominante. (AR) autosómica recesiva (Carriozza 2011)

1.2.1 Convulsiones Neonatales Familiares Benignas

Una convulsión neonatal es la manifestación de una disfunción del sistema nervioso central. Los recién nacidos pueden convulsionar por múltiples factores, como parto laborioso, hipoxia, acidosis/hipercapnia, hipoglucemia o hipocalcemia. Este tipo de sintomatología en el neonato es en sí un marcador de morbilidad neurológica y su control será factor pronóstico del desarrollo del niño. No siempre son fáciles de reconocer, pueden ser asintomáticas, presentarse como crisis generalizadas, movimientos oculares, bucolinguales o apneas; debido a la estructura cerebral neonatal, suelen dejar secuelas neurológicas a largo plazo, siendo uno de los factores de más alto riesgo para convulsiones futuras a lo largo de la vida (Villeneuve, 2002; Carriozza 2011; Solis 2011).

La convulsión neonatal familiar benigna es una enfermedad epiléptica rara, que se caracteriza por convulsiones generalizadas, no provocadas; o por convulsiones tónico-clónicas. Estas convulsiones se inician alrededor del tercer día de vida y desaparecen espontáneamente después de varias semanas o meses. En la mayoría de los casos el desarrollo es normal y solamente de 10 a 15 % de los pacientes presentan episodios epilépticos más tarde (Ronen et al., 1993).

Las convulsiones neonatales familiares benignas corresponden a una enfermedad genética de tipo autosómica dominante (Biervert et al., 1998). El patrón de herencia autosómica dominante se da cuando el alelo alterado es dominante sobre el normal y basta una sola copia para que se exprese la enfermedad. Al ser autosómico, el gen se encuentra en uno de los 22 pares de cromosomas no sexuales, o autosomas, pudiendo afectar con igual probabilidad a hijos e hijas. El alelo alterado se puede haber heredado tanto del padre como de la madre. Normalmente se da en todas las generaciones de una familia. Cada persona

afectada tiene normalmente un progenitor afectado y una probabilidad del 50% con cada hijo de que este herede el alelo mutado y desarrolle la enfermedad autosómica dominante (Figura 1).

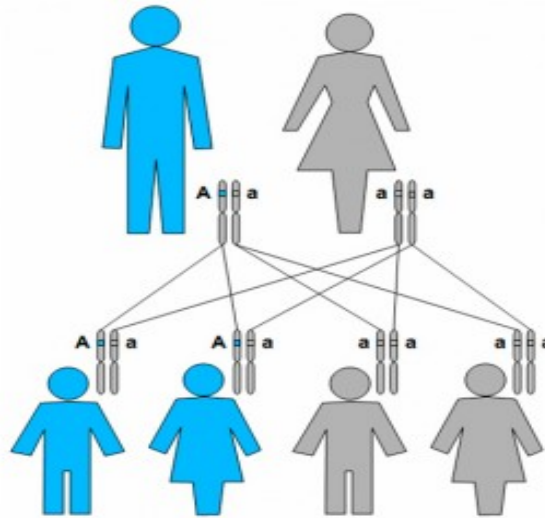


Fig. 1. Patrón de herencia autosómica dominante con un progenitor afectado (azul). Se observa como el gen autosómico del padre enfermo se trasmite al 50 % de su descendencia.

1.3 Localización de los canales tipo-M en el cerebro

Estos canales se distribuyen en el cerebro con altas concentraciones en áreas críticas donde se originan convulsiones, que incluyen la neocorteza, el hipocampo, y el tálamo (Klinger et al., 2011; Tinel et al., 1998). Por lo menos en ratón, KCNQ2 está presente tres días después del nacimiento y su expresión se incrementa por un factor de 2.5 en una semana después del nacimiento y permanece hasta la etapa adulta. KCNQ3 es muy baja en etapas tempranas; pero aumenta continuamente su expresión hasta que en etapa adulta llega al doble. En la figura 2, se muestra la localización de mRNA para los canales tipo-M.

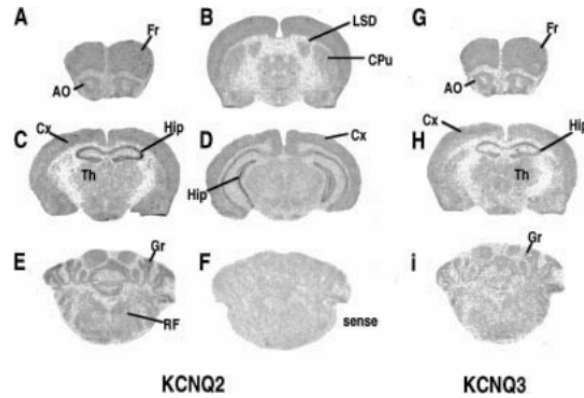


Fig. 2. Localización de mRNA de KCNQ2 (A-F) y KCNQ3 (G-I) en cerebro de ratón. Micrografías de los autoradiogramas en una sección coronal de cerebro de ratón. Abreviaciones: AO, núcleo olfatorio anterior, CPu, núcleo caudado putamen; Cx, neocorteza; Fr, corteza olfatoria frontal; Gr, capa granular cerebelar; LSD, núcleo septal lateral; RF, formación reticular; Th, tálamo. (Tinel et al., 1998).

También se le ha localizado en el neocóstriado (Shen et al., 2005). Con las técnicas de hibridación “*in situ*” (Saganich et al., 2001) e inmunocitoquímica (Cooper et al., 2000) se ha mostrado que las subunidades KCNQ se expresan en el neocóstriado.

1.3.1 Localización de los canales tipo-M en la neurona

En la neurona, los canales tipo-M KCNQ2, (llamados también KV7.2) y KCNQ3, (llamados también KV7.3) se localizan en el segmento inicial del axón y/o en los nodos de Ranvier (Devaux et al., 2004; Schwarz et al., 2004). Su función es inhibir la alta frecuencia de disparo de potenciales de acción (PA) producto de un incremento en la hiperpolarización. En la figura 3 se muestra un esquema donde se puede observar la localización de los canales KCNQ en una neurona.

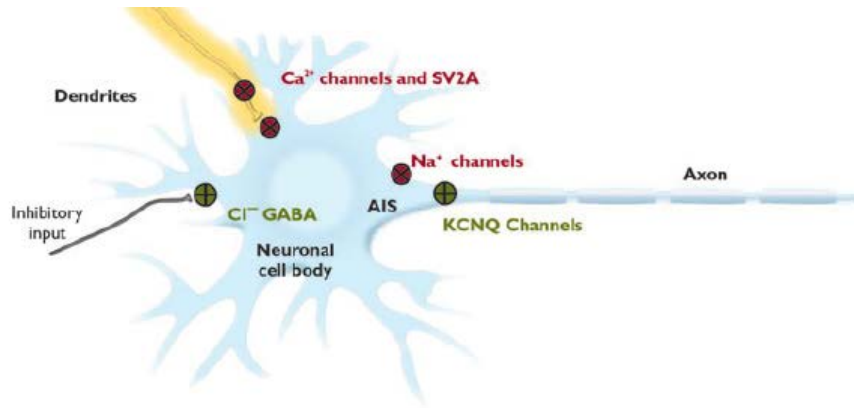


Fig. 3. Localización de diversos canales en la neurona. Canales de Ca^{2+} , SV2A y canales GABA se encuentran en las dendritas. Los de Na^+ y K^+ dependientes de voltaje están al inicio del axón.

1.4 Función de los canales de K^+ tipo-M

Los canales de K^+ tipo-M modulan la excitabilidad de la membrana. Para que la neurona produzca PA es necesario que el potencial dentro de ella alcance el umbral de disparo. A este potencial, el canal de Na^+ dependiente de voltaje se abre y produce una despolarización inmediata. En el reposo (cuando no se ha estimulado la neurona) el potencial de membrana (PM) puede estar muy lejos del umbral de disparo. Existen ciertos neurotransmisores o neuromoduladores que alejan o acercan el potencial de membrana al umbral de disparo. Entre más cerca se encuentre el PM al umbral, más fácilmente se produce un PA. Entonces, se dice que la neurona aumentó su excitabilidad. Cuando el PM se aleja del umbral, la neurona disminuye su excitabilidad.

Todas las corrientes de K^+ son salientes y en consecuencia tienden a que la neurona pierda cargas positivas llevando el PM siempre a valores más negativos. Por ejemplo, cuando el PM se despolariza por la entrada de Na^+ , el voltaje alcanza valores positivos (como +40 mV). En este voltaje el canal de K^+ dependiente de voltaje se abre y repolariza a la neurona, regresa el PM al reposo e incluso puede acercarse a valores más negativos, es decir, se hiperpolariza (Hodgkin y Huxley, 1952). La corriente del canal tipo-M es de K^+ , en consecuencia, tiende a llevar el PM al reposo (repolariza), la diferencia es que este canal se abre a valores por

debajo del umbral: repolariza la neurona antes que llegue al umbral y no la deja disparar PA.

Los canales de K^+ tipo-M tienen como función la adaptación neuronal. La adaptación es la capacidad neuronal de modular una respuesta de disparo de potenciales de acción en el tiempo. De hecho, durante entradas despolarizantes de larga duración, la activación lenta y no inactivante de la corriente tipo-M tiende a regresar el potencial de membrana al potencial de reposo, y esto limita la repetición de disparos causando una adaptación en la frecuencia (Rogawski, 2000, Maljevic et al., 2008). Este proceso juega un papel importante en la extracción de la información de un entorno en constante cambio que es el producto de factores como los canales iónicos, las sinapsis y la dinámica de la red neuronal (Kobayashi y Kitano, 2016). El presente trabajo se enfoca en la adaptación a nivel de una neurona individual.

Cuando en la neurona existen canales de potasio tipo M, un tren de potenciales de acción se ve “frenado”. A potenciales de -60 mV o más negativos, la corriente-M está cerrada y se dispara el PA. A potenciales de -40 o cercanos al umbral, la corriente-M se activa y evita la generación de más PA (Figura 4).

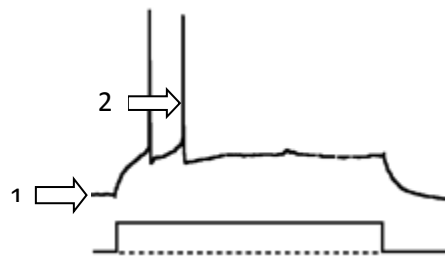


Fig. 4. Adaptación de una neurona que tiene canales tipo-M. La flecha en 1, es el potencial donde estos canales están cerrados. La flecha en 2, es el potencial donde se abren los canales tipo-M. la corriente de K^+ saliente que no inactiva, obliga a que el PM se quede debajo del umbral y deja de producir PA.

El canal tipo-M está asociado a un receptor al que se une la acetilcolina (o un agonista). Al activarse el receptor disminuye la concentración de $PI(4,5)P_2$ (que

está fosforilando al canal) y el canal se cierra; en consecuencia, la neurona genera trenes de PA (Figura 5).

Cuando existe una mutación en el canal-M, la corriente iónica se ve disminuida o incluso suprimida; la neurona genera, entonces, trenes de PA que llevan a las convulsiones.

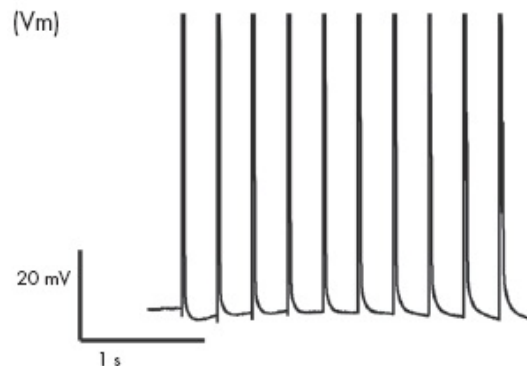


Fig. 5. Tren de disparo de PA sin adaptación. Una mutación del canal tipo-M, evita la corriente de K^+ y la neurona alcanza el umbral de disparo con más facilidad (se incrementa la excitabilidad) y genera trenes de PA.

Los canales de K^+ dependientes de voltaje tienen diferentes papeles fisiológicos. Mientras varios canales como $K_v1.1$, $K_v1.4$, $K_v3.4$, $K_v4.1-4.3$ están implicados en la repolarización durante un PA. Los canales $K_v7.2$ y $K_v7.3$ se activan en un rango subumbral y son importantes para la regulación del potencial de membrana y previenen el disparo repetitivo (Figura, 6).

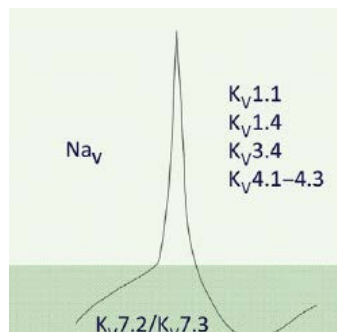


Fig. 6. Esquema de un PA y canales dependientes de voltaje implicados en el curso del voltaje. Los canales $K_v7.2$ y $K_v7.3$ regulan la excitabilidad de la membrana (Maljevic y Lerche, 2014).

1.5 Familia de genes que codifican canales de K⁺

La familia de genes que codifican los canales de K⁺ se muestra en la figura 7. De acuerdo con la evolución, los canales se originaron de un gen común; a partir de este se derivaron varias ramas que dieron lugar a diferentes genes; por ejemplo, genes que codifican para los siguientes canales: (1) canales rectificadores, (2) Maxi K, (3) Shaker, (4) Shaw, (5) Kv5, (6) Shab, (7) Kv9, (8) Shal, (9) HERG, (10) 2P/4TM y (11) Kv7 (KCNQ).

Los canales de K⁺ son importantes, regulan la excitabilidad de algunas neuronas centrales y periféricas y una amplia variedad de procesos celulares. Existen alrededor de 100 genes que codifican las subunidades que forman el poro en el genoma de mamíferos, de manera que se tiene una diversidad de subgrupos de canales iónicos y una de las más grandes familias de proteínas de señalización celular. La familia de los canales de K⁺ dependientes de voltaje se muestra en la figura 7.

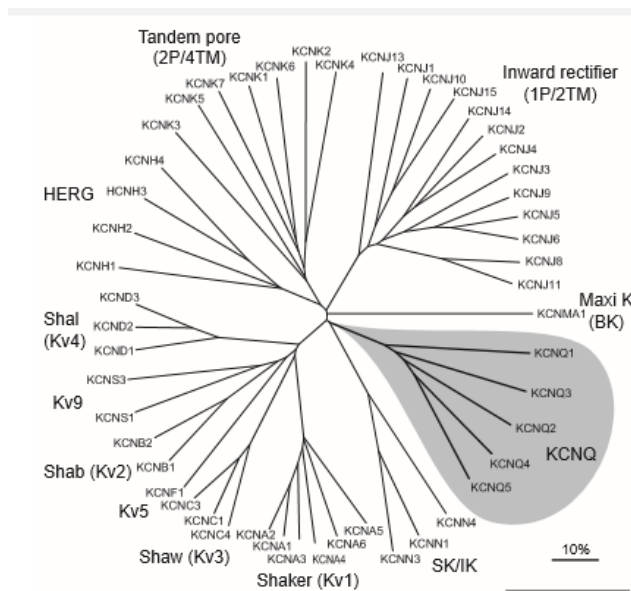


Fig. 7. Evolución de los canales de K⁺. Dentro de los canales iónicos, los de K⁺ son los que tienen mayor diversidad molecular y distribución filogenética. Se pueden agrupar en tres superfamilias de acuerdo al número de poros y de segmentos transmembranales: (1) la superfamilia S6 que incluye a todos los canales de K⁺ con un solo poro y seis segmentos transmembranales (por ejemplo: Kv, eag, KCNQ, slo y SK); (2) la superfamilia de un poro y dos segmentos transmembranales (ejemplo, la familia Kir); (3) la familia de dos poros y ocho segmentos transmembranales (ejemplo: TOK1, TWIK-1, TREK-1, TASK, etc.) (Rogawski, 2000).

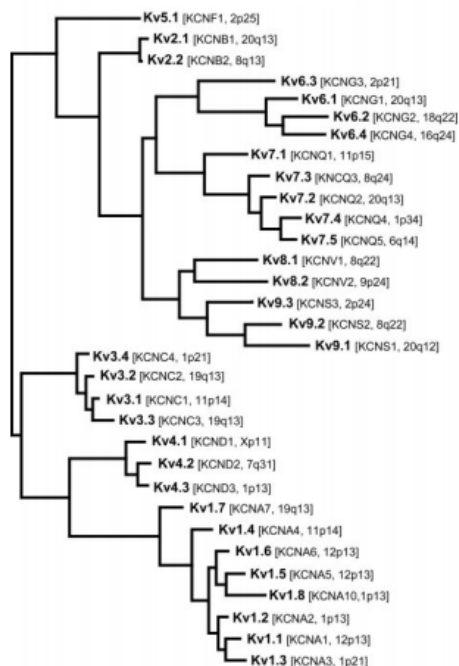


Fig. 8. Relación de la nomenclatura de los canales de potasio Kv y los genes que los codifican (KCN). Los canales que interesan en este trabajo son los Kv7.2 y Kv7.3.

Una familia de 40 genes forman el grupo de canales de K^+ gatillados por voltaje en humanos, donde se incluyen canales de K^+ activados por Ca^{++} , rectificadores de entrada (KIR) y canales con dos poros (K2P) (Gutman et al., 2005). Los canales codificados por los genes KCNQ presentan una estructura formada por seis dominios transmembranales y una aza que forma el poro. En la nomenclatura (HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) e International Union of Pharmacology (IUPHAR1)) este canal forma parte de la familia de los canales Kv7 (Figura 8). Se trata de un heterotetrámero formado comúnmente por dos subunidades: Kv7.2 y Kv7.3 (Delmas y Brown, 2005).

1.5.1 Estructura molecular de los canales de K^+ dependientes de voltaje

Existen diferentes canales de K^+ dependientes de voltaje, como se ha descrito. Desde el punto de vista de su estructura se pueden agrupar en tres tipos: (1) canales que presentan seis segmentos transmembranales y un poro (6TM/1P), (2) de cuatro segmentos transmembranales y dos poros (4TM/2P) y (3) dos segmentos

transmembranales y un poro (2TM/1P) la conformación que adquieren se muestra en la figura 9.

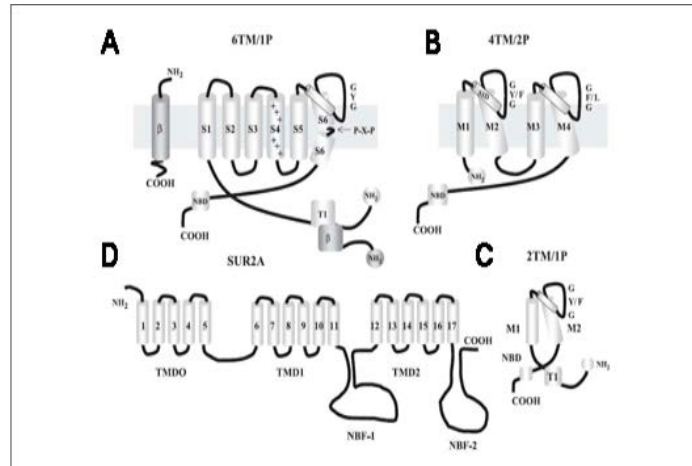


Fig. 9. Topología estructural de canales de K^+ . (A) canales con seis segmentos y un poro. (B) canales con cuatro segmentos y dos poros. (C) con dos segmentos transmembranales y un poro. (D) tres dominios transmembranales y dos dominios de unión a nucleótidos.

1.5.2 Canales de K^+ tipo-M y su relación con segundos mensajeros

Como se ha mencionado, los canales de K^+ tipo-M, tienen un importante papel en el control de la excitabilidad neuronal. Su importancia se refleja cuando mutaciones en el canal producen un tipo de epilepsia neonatal y fármacos que lo bloquean incrementan la capacidad de aprendizaje y memoria. Diversos neurotransmisores y neuropéptidos regulan al canal, lo que demuestra una versatilidad del control de la excitabilidad neuronal.

En este sentido, las técnicas de clonación han permitido la identificación de dos tipos de receptores: ionotrópicos (nicotínicos), donde el receptor forma parte del mismo canal y receptores metabotrópicos (muscarínicos) alejados del canal, todos estos acoplados a proteínas G. Cada uno de ellos tendrá distinto impacto sobre la excitabilidad de la célula postsináptica. Los receptores ionotrópicos producen acciones sinápticas rápidas, en el orden de milisegundos; mientras que los de tipo metabotrópico sus efectos tardan varios segundos o hasta minutos.

La corriente-M se produce en canales comandados por receptores metabotrópicos muscarínicos. Existen, hasta la fecha, cinco tipos de receptores muscarínicos de

tipo helicoidal acoplados a proteínas G. Se han denominado M1 al M5 (Hulme et al., 1990; Caulfield y Birdsall, 1998); los genes que codifican a cada uno de ellos se han clonado y se denominan m1, m2, m3, m4 y m5 (Wess, 1996). Con base en su farmacología, se encuentran dos familias: la familia M1 formada por los receptores M1, M2 y M3 están acoplados a la activación de proteínas Gs, con la consecuente producción del segundo mensajero AMPc. La familia M2 formada por los receptores M2 y M4 que inhiben la formación de AMPc, y por lo tanto activan canales de K⁺. También en algunas neuronas, los receptores M1, M3 y M5 interactúan con proteínas G de tipo Gq, y M2 y M4 interactúan con proteínas G de tipo Gi/Go (Haga, 2013).

Cuando un ligando se une a un receptor metabotrópico interviene una cascada de señalización que ocurre con la siguiente secuencia: proteína G → enzimas efectoras → segundos mensajeros → finalmente el canal iónico. El concepto de modulación se aplica justo a este caso. Los canales son modulados cuando se alteran sus propiedades biofísicas, como consecuencia de su modificación bioquímica (estructural), producidas por cascadas de señalización disparadas por hormonas o neurotransmisores (Kaczmarek y Levitan, 1987).

Los neurotransmisores y neuropéptidos al estimular sus receptores metabotrópicos provocan cambios en la probabilidad de apertura y/o dependencia de voltaje del canal modulado, y por lo tanto un aumento o inhibición de la corriente macroscópica o de sus parámetros cinéticos (activación, desactivación, etc.)

1.6 Estructura de los receptores (metabotrópicos) de acetilcolina tipo muscarínico

Los canales de K⁺ tipo-M están asociados a un receptor denominado muscarínico. El concepto de receptor muscarínico fue originalmente reportado por Dale en 1914, aunque él no usó el término receptor. Se trata de un receptor activado por acetilcolina y su efecto es mimetizado por muscarina. Está formado por siete segmentos transmembranales y está asociado a proteína G. Se ha demostrado homología entre los receptores muscarínicos M1, M2 con el receptor β adrenérgico y el receptor a rodopsina. Todos ellos acoplados a proteína G

(GPCRs) y todos tienen siete segmentos transmembranales (7-TM). La figura 10, muestra la estructura molecular del receptor muscarínico M1.

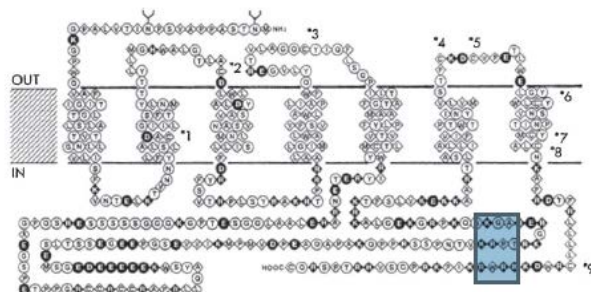


Fig. 10. Esquema del receptor M1. Se observan los siete segmentos transmembranales. A este receptor le llega una molécula que se le une, llamada ligando.

Los agonistas a los receptores muscarínicos son: acetilcolina, muscarina, carbacol, metacolina, betanecol, polícarpina, arecolina y axotremorina. En seguida se describen brevemente los dos primeros.

El ligando endógeno del receptor muscarínico es la acetilcolina. Fue descubierto por Loewi, Dale y otros con varios experimentos realizados entre 1921 a 1934 (Nachmansohn, 1937). La acetilcolina es conocida como un neurotransmisor tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en el periférico (SNP) (Soto, 2005). La figura 11, muestra su estructura química. Se trata de un éster de ácido acético y la colina.

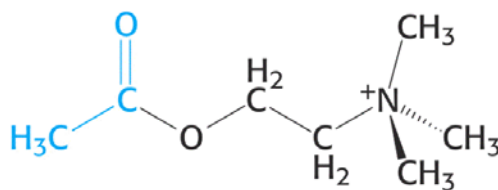


Fig. 11. Estructura química de la acetilcolina. En azul el éster y en negro la colina.

La muscarina es un producto natural de ciertos hongos que incluyen al *Amanita muscaria*. Imita las acciones de las neuronas parasimpáticas: vasodilatación de los vasos, bradicardia, constricción de los bronquiolos, aumento en la secreción de

saliva y constricción de las pupilas del ojo. Su fórmula química se muestra en la figura 12.

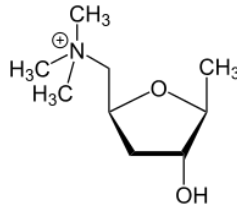


Fig. 12. Fórmula química de la muscarina. Se trata de un alcaloide.

1.7 Estructura del canal de potasio tipo-M

Estos canales presentan cuatro subunidades, formadas cada una por seis segmentos transmembranales. Molecularmente, cuentan con una región altamente conservada, rica en residuos de arginina cargados positivamente. En el asa que forma el poro, la secuencia puede variar; sin embargo, generalmente está formada por: Thr-x-x-Thr-x-GlyTyr-Gly (Schroeder et al., 1998; Yang et al., 1998; Tinel et al., 1998; Cooper et al., 2000).

La figura 13, muestra un esquema de los seis segmentos transmembranales que forman una unidad. El canal de K^+ tipo-M está formado por cuatro subunidades: dos Kv7.2 y dos Kv7.3; de manera que forman un canal heterotetramérico

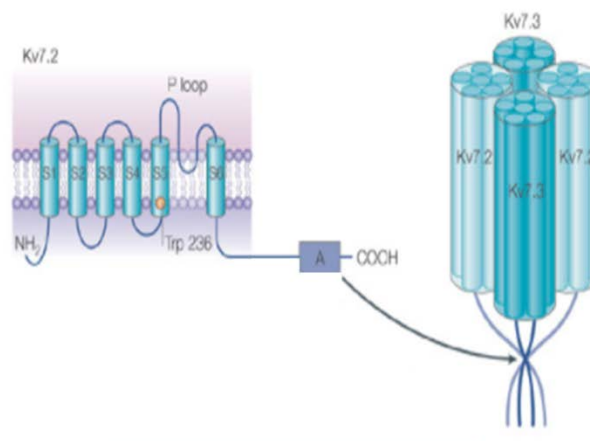


Fig. 13. Esquema de un canal de K^+ tipo-M. El canal está formado por cuatro subunidades: dos Kv7.2 y dos Kv7.3. El canal está modulado por fosforilación con fosfatidilinositol, PI(4,5)P₂ (Delmas y Brown, 2005).

Para que los canales de K^+ tipo-M se activen, deben estar unidos a fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato ($PI(4,5)P_2$) (Figura 14). Las subunidades Kv7.3 presentan una alta afinidad a $PI(4,5)P_2$, en tanto que las Kv7.2 tienen baja afinidad (Telezhkin et al., 2012).

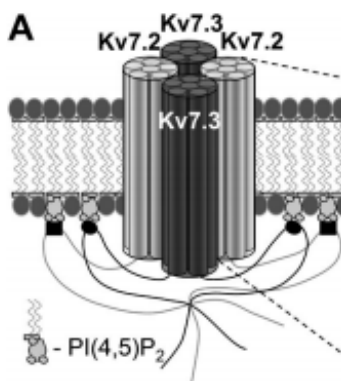


Fig. 14. Esquema del canal tipo-M. La molécula $PI(4,5)P_2$ se une principalmente a las subunidades Kv7.3.

1.7.1 Inhibición del canal tipo-M

Con respecto a la corriente de K^+ tipo-M, es inhibida por agonistas muscarínicos, la hormona luteinizante, la sustancia P, la bradicidina, la angiotensina II, los cannabinoides y el glutamato (Pfaffinger, 1988a, Takano et al., 1996; Jones et al., 1995; Shapiro et al., 1994; Tokimasa y Akasu, 1990; Schweitzer, 2000; Womble et al., 1994; Acosta, 2013; Adams y Brown, 1980). El receptor M1 está asociado con la inhibición de la corriente-M en las neuronas del ganglio cervical en ratas. No queda claro qué tipo de receptor está involucrado en la inhibición de la corriente en las neuronas centrales. En CA1, por ejemplo, al parecer están involucrados M2, M3 y M4 (Wess, 1996). M1 no inhibe la corriente en estas neuronas (Rouse et al., 2000). Sin embargo, M1 se le encuentra en neuronas del estriado y del hipocampo.

La activación de la proteína quinasa A (PKA) mejora las corrientes de Kv7.2 / Kv7.3, un efecto que se anula mediante la mutación de un sitio NH2-terminal (S52) que es "sensor" de PKA. La activación de la tirosina quinasa produce una inhibición

lenta de la expresión de Kv7.2 / Kv7.3 a través de un mecanismo que implica tirosinas en las terminales NH₂ y COOH en Kv7.3 (Jia et al., 2007).

La corriente de potasio tipo-M es reprimida por la activación de receptores acoplados a G_{q/11} a través de la activación de PLC (fosfolipasa C) (Figura 15) y el agotamiento de PI(4,5)P₂ (Delmas y Brown, 2005).

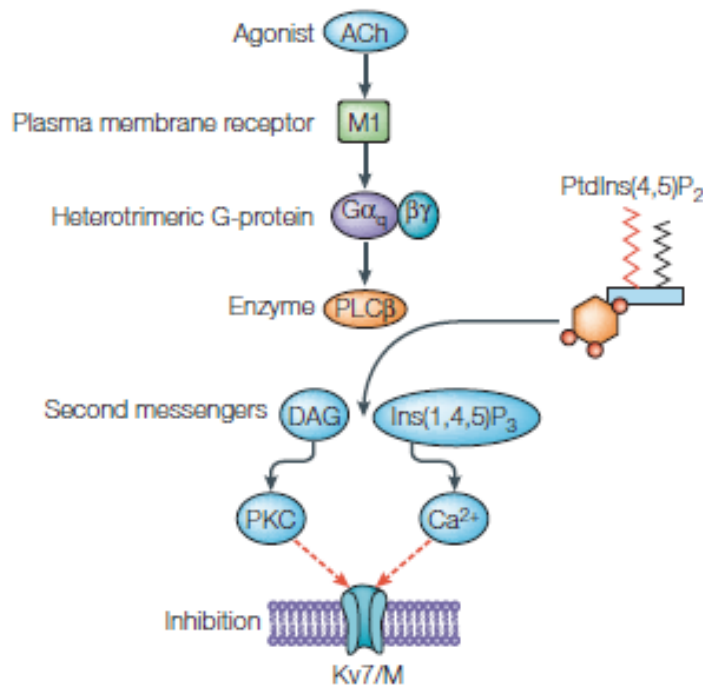


Fig. 15. Cascada bioquímica en el canal metabotrópico tipo-M. La acetilcolina (ACh) se une al receptor tipo M1 acoplado a la proteína Gα_q. Se activa la fosfolipasa C que a su vez actúa sobre PI(4,5)P₂. Se generan los segundos mensajeros: diacilglicerol (DAG) e IP3 (Ins(1,4,5)P₃). Por un lado, DAG actúa en el canal Kv7/M por la vía de la proteína quinasa C. En tanto que IP3 saca Ca²⁺ del retículo para que actúe en el canal. La consecuencia es una depleción de PI(4,5)P₂ (que está unido al canal) cerrando el canal; la corriente I_M se bloquea y aumenta la excitabilidad celular (Delmas y Brown, 2005).

La supresión ocasionada por el receptor acoplado al canal (Horowitz et al., 2005; Suh et al., 2004) o por la translocación inducible de PIP2 5-fosfatasa (Suh et al., 2006) solo toma 10 s, es comparable a la estimación de tiempo del agotamiento de PI(4,5)P₂ en la membrana. Esto significa que PI(4,5)P₂ solo necesita unos pocos segundos para disociarse de la proteína del canal. La recuperación de la corriente, debido a la inhibición, necesita de la síntesis de PI(4,5)P₂. La corriente se recupera en aproximadamente de 100 a 200 segundos, este valor es

consistente a la estimación de la lenta resíntesis de PI(4,5)P₂ (Suh y Hill, 2002; Winks et al., 2005) (Figura 16).

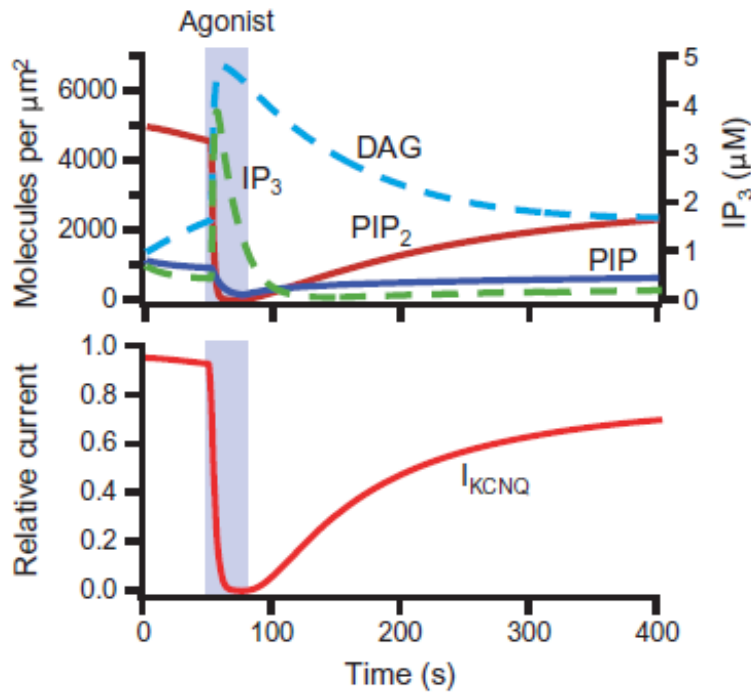


Fig. 16. Simulación computacional de los tiempos de acción de la cascada de segundos mensajeros en I_M . La gráfica superior muestra una barra del tiempo de acción de agonista (por ejemplo, muscarina). Alrededor de 10 s existe una baja de PI(4,5)P₂ acoplada al canal-M. Producto del incremento del DAG (línea discontinua en azul) y del IP₃ (línea discontinua verde). La resíntesis de PI(4,5)P₂ es lenta como puede verse en el trazo rojo. La gráfica inferior muestra cómo la corriente se hace cero debido al cierre de los canales-M, inmediatamente a la acción del agonista. La recuperación de la corriente tarda 200 a 400 s (Suh y Hille, 2006).

La figura 17, muestra un esquema que resume la inhibición de la corriente-M producto de la cascada de segundos mensajeros.

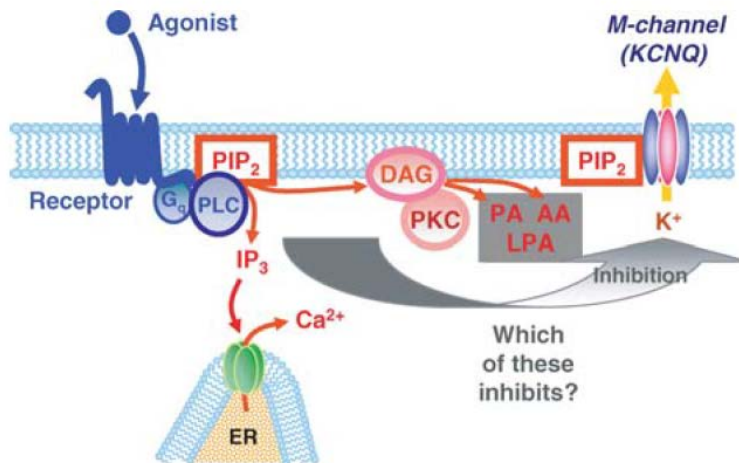


Fig. 17. Esquema de la inhibición de la corriente I_M por el receptor acoplado a segundos mensajeros. El receptor muscarínico M1 activa PCL, que divide PI(4,5)P2 en DAG e IP3. La salida de Ca^{2+} del retículo endoplásmico es producto de la acción de IP3; en tanto que DAG activa PKC. DAG también se metaboliza a ácido fosfatídico (PA), ácido araquidónico (AA) y ácido lisofosfatídico (LPA). (Suh y Hille, 2007).

1.7.2 Corriente iónica tipo-M y la electrofisiología de los canales de K^+ tipo-M

La corriente tipo-M (I_M) fue descrita por primera vez en 1980 por Brown y Adams en neuronas de vertebrados. El protocolo experimental de estos autores consistió en colocar el voltaje de la neurona en -30 mV (potencial de sujeción) y estimular con pulsos de voltaje negativos de -40 a -90 mV. La figura 18, muestra seis pulsos de voltaje de: -40, -50, -60, -70, -80 y -90 (mV) (de izquierda a derecha); se observa que los tres primeros pulsos, producen la aparición de la corriente (I_M) con una constante de tiempo que va incrementando. En los siguientes tres trazos, el canal se ha cerrado y desaparece la corriente. En este trabajo no se usó la tetrodotoxina (TTX) para bloquear los canales de Na^+ ; de manera que fue necesario colocar el potencial de membrana en -30 mV y estimular con pulsos negativos (Brown y Adams 1980).

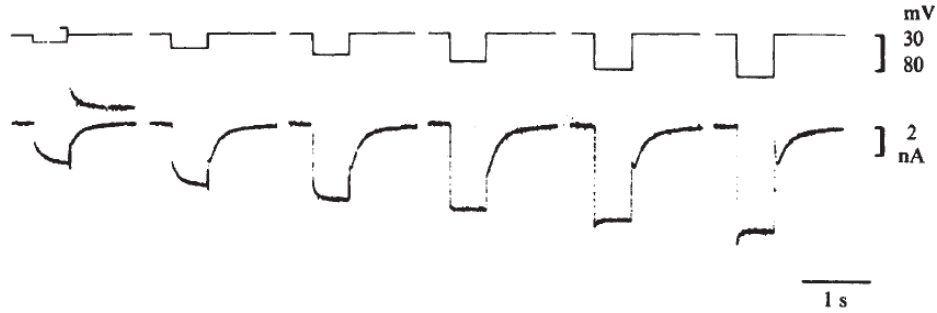


Fig. 18. Corriente registrada (trazos inferiores) como respuesta a pulsos de voltaje (trazos superiores). Los primeros tres trazos de corriente muestran la activación de I_M ; los tres siguientes ya no presentan la corriente.

La I_M es producto del paso de iones K^+ por este canal. En potenciales de comando menores de -60 mV el canal se cierra. En cambio a potenciales mayores a este potencial la corriente se incrementa de manera sigmoideal, con un máximo entre -10 a 20 mV (Figura 19).

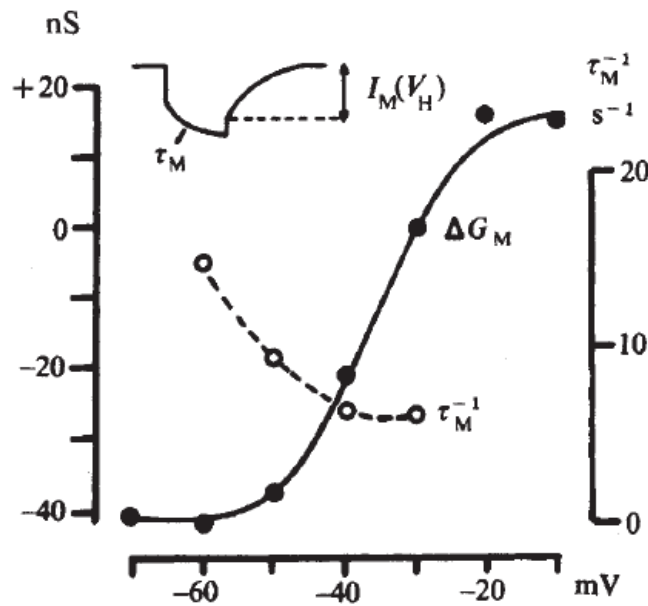


Fig. 19. Gráfica de la conductancia y la constante de tiempo de los registros de Brown y Adams. La conductancia se obtiene de dividir la corriente I_M registrada entre la diferencia del voltaje (V_H) y el voltaje de equilibrio (V_M). Su incremento es de tipo sigmoideal y va entre -40 a 20 nS. La reciproca de la constante de tiempo τ_M sigue una curva exponencial decreciente (el eje derecho corresponde a la reciproca de la constante de tiempo, va entre 0 y 20 1/s).

Como se pueden observar los valores de la constante de tiempo, se trata de una corriente lenta. En valores de -60 mV la constante de tiempo es menor y aumenta a valores más despolarizados (su recíproca es lo contrario).

Para obtener el potencial de equilibrio de esta corriente se mide el paso de la corriente desde la corriente en el voltaje de sujeción ($I(V_H)$) al inicio de la corriente I_M y el paso de corriente desde su estado estable ($I_{ss}(V)$) de regreso a $I(V_H)$. Como puede verse en la figura 20, $I(V_H)$ sigue un proceso lineal; en tanto que $I_{ss}(V)$ es prácticamente exponencial. El cruce de estos dos trazos corresponde al potencial de equilibrio de I_M .

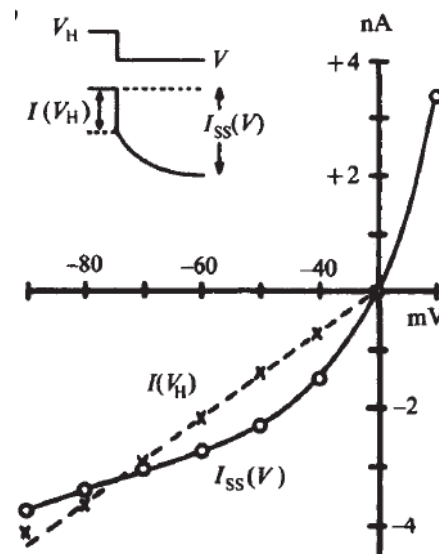


Fig. 20. Gráfica de la corriente instantánea $I(V_H)$ y la corriente en el estado estable $I_{ss}(V)$. Los trazos insertos corresponden al pulso de voltaje y la corriente generada como respuesta; se ilustra cómo se obtiene la corriente instantánea ($I(V_H)$) y la corriente estado estable ($I_{ss}(V)$). En este caso el potencial de equilibrio es de -70 mV, voltaje en donde se cruzan las dos curvas.

Brown y Adams (1980) mostraron que la muscarina disminuye la corriente I_M . La figura 21, muestra una disminución de la corriente después de aplicar 10 μ M de muscarina. El nombre de corriente I_M hace alusión a la muscarina.

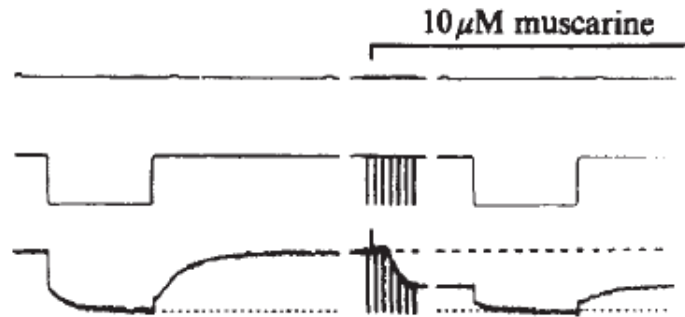


Fig. 21. El trazo de la izquierda es el control. El trazo de la derecha es el resultado de la aplicación de muscarina; se observa una disminución en la corriente. El pulso de estímulo tiene un voltaje de sujeción de -30 mV, la amplitud corresponde a -60 mV y la duración es de 700 ms. Se observa una disminución en la corriente.

Una característica de la I_M es su susceptibilidad a la inhibición fisiológica y farmacológica. En rana, por ejemplo, es inhibida por agonistas a receptores a acetilcolina tipo muscarínicos, a nucleótidos de uridina, y iones de Ba^{2+} externos. Esta corriente también se observó en ganglio simpático de rata con características similares. Después fue descubierta en varias neuronas del sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP) (Ghezzi, 2017).

Los estudios en neuronas del SNC han mostrado que cuando son estimuladas con pulsos cuadrados de corriente responden con un tren de disparos de potenciales de acción, seguidos de un decremento en la frecuencia. Este fenómeno es llamado adaptación a la frecuencia de disparos; es usualmente mediada por corrientes de K^+ lentas, tales como la corriente tipo-M (Brown and Adams 1980; Adams et al. 1982) y la corriente de K^+ mediada por calcio (I_{AHP}) ((Brown and Griffith 1983; Madison y Nicoll 1984).

El estudio de la electrofisiología de canales tipo-M de humanos se ha realizado transfiriendo los canales a células de cultivo (células de ovario de hámster). En este caso la corriente I_M puede ser registrada sin necesidad del bloqueo de otras corrientes o con un protocolo de estímulo con un potencial de sujeción de -30 mV. Los estudios se pueden realizar con un potencial de sujeción de -80 mV despolarizar con pulsos entre -120 a 80 mV con una duración de 500 ms. La figura

22, muestra los resultados en un canal con subunidades KCNQ2 y con subunidades KCNQ2 + KCNQ3 (Rundfeldt y Netzer, 2000).

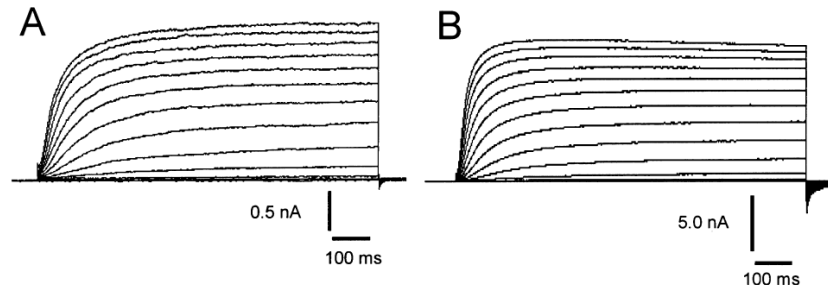


Fig. 22. Corrientes de K^+ en canales humanos transferidos a ovocitos. (A) en canal formado por 4 subunidades KCNQ2. (B) en canal con 2 subunidades KCNQ2 + 2 subunidades KCNQ3. En ambos casos el potencial de membrana fue fijado en -80 mV, el pulso de estímulo con una duración de 500 ms, con voltajes comando entre -120 a +60 mV. Se observa una corriente de salida de K^+ que no inactiva.

En una canalopatía la corriente tipo-M cae. La figura 23, muestra la corriente registrada en canales Kv7.2 normales y en una mutación en la enfermedad CNFB.

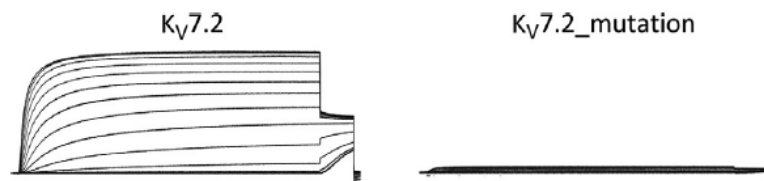


Fig. 23. Registro de corriente tipo-M. A la izquierda, un canal KV7.2 normal, se observa una corriente de salida de K^+ . A la derecha, un canal KV7.2 mutado (haploinsuficiencia), se observa que prácticamente no existe corriente (Maljevic y Lerche, 2014).

Como un ejemplo de la acción de I_M en otras neuronas del SNC, se ha demostrado que las neuronas espinosas medianas están fuertemente moduladas por acetilcolina (Kawaguchi, 1993). Todas las neuronas espinosas medianas presentan altos niveles del receptor muscarínico M1 que modula canales KCNQ. Las interneuronas colinérgicas en el neocórtico regulan el estado de disparo de potenciales de acción (PA) y el estado silente (silent up states) producido por la apertura de los canales KCNQ (Shen et al., 2005) (Figura 24).

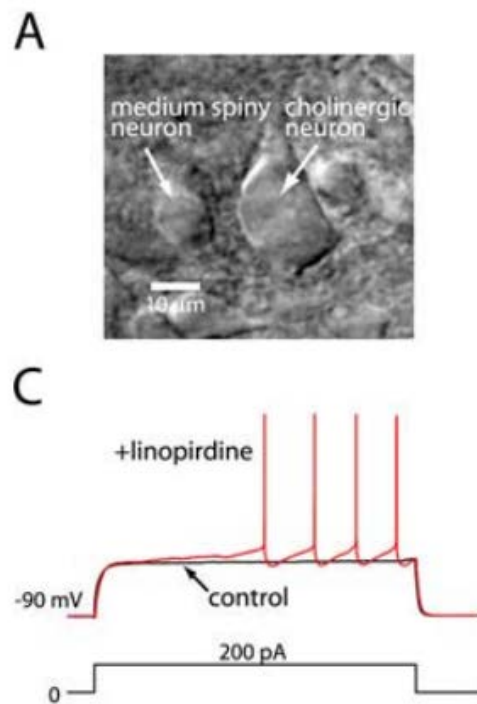


Fig. 24. (A) Micrografía de una neurona espinosa mediana y una interneurona colinérgica. (B) registro de la respuesta electrofisiológica de la neurona espinosa mediana ante un estímulo de corriente de 200 pA y 200 ms de duración: control, se observa un trazo sin potenciales de acción (silente), el canal-M se encuentra abierto (presencia de I_M) y después de la aplicación de linopirdina (agonista que activa al receptor muscarínico y en consecuencia a la cascada de señalización, el canal se cierra y como consecuencia I_M se suprime) aparecen potenciales de acción por un aumento en la excitabilidad de la neurona.

1.8 Canalopatías epilépticas

Todas las células excitables (neuronas, células musculares lisas, esqueléticas y cardíacas) presentan en su membrana celular una serie de proteínas que forman canales por donde pasan iones (canales iónicos). Existe una gran diversidad de canales iónicos que son fundamentales en las funciones celulares. Se abren y cierran en respuesta a las señales eléctricas, mecánicas y químicas. Se tienen al menos tres tipos de canales: canales dependientes de voltaje, canales unidos a ligando y canales metabotrópicos. El actual interés en el estudio de estos canales se fundamenta por presencia de ciertas alteraciones hereditarias o adquiridas, llamadas canalopatías, en las que el funcionamiento fisiológico de los canales está abolido o modificado (Carizosa, 2011). Las canalopatías están involucradas en

entidades clínicas muy variadas, como las miopatías hereditarias, ataxias episódicas, algunos tipos de epilepsias, síndrome del QT largo y la migraña hemipléjica familiar, entre otras. La primera canalopatía en humanos se identificó en 1991 (Rojas et al., 1991), en la actualidad se conocen alrededor de diez genes mutados sólo para los canales de potasio (K^+), que se relacionan con diversas enfermedades neurológicas, entre ellas la epilepsia (Jentsch et al., 2000; Carizosa, 2011). Las canalopatías genéticas son el resultado de mutaciones en los genes que codifican un canal iónico o alguna de sus subunidades. Para la mayoría de las canalopatías la terapia es paliativa y se dirige a la sintomatología de la enfermedad (tratamiento médico) o a los canales iónicos propiamente, aumentando o disminuyendo la corriente iónica correspondiente (Gunthorpe et al., 2012). Para un número significativo de pacientes la terapia a menudo es limitada debido a la falta de eficacia y a la tolerancia misma a los medicamentos. Actualmente, se tiene la esperanza de una terapia génica como un potencial tratamiento de las canalopatías (tratamiento biológico) que permita una mayor eficacia (Wykes y Lignani, 2017). La tabla 2 resume las canalopatías epilépticas descritas hasta ahora.

CANALOPATÍAS EPILÉPTICAS					
Tipo	Siglas	Cromosoma	Gen	Canal	Receptor
Convulsiones neonatales familiares benignas	CNFB	20q13.2	KCNQ2	K^+	V-D
		8q24	KCNQ3	K^+	V-D
Epilepsia generalizada con CF plus	EGCF+	19q13.1	SCN1B	Na^+	V-D β_1
		2q24	SCN1A	Na^+	V-D α_1
Epilepsia frontal nocturna AD	EADNFL	20q13.2q13.3	CHRNA4	Na^+	Nicot alfa 4
		15q24	CHRNA3	Na^+	Nicot alfa 3
		1p21.1-q2	CHRNA2	Na^+	Nicot beta 2

Tabla 2. Canalopatías epilépticas. Los canales de K^+ y Na^+ son afectados por diferentes mutaciones y producen epilepsias. Los genes afectados son KCNQ, SCN y CHRN.

1.8.1 Mutaciones en los canales de K⁺ tipo-M (KCNQ)

En varias enfermedades que producen síndromes epilépticos se han encontrado mutaciones en los genes que codifican canales iónicos: La epilepsia nocturna del lóbulo frontal es causada por mutaciones en el receptor de acetilcolina de tipo nicotínico en las neuronas, aquí se afectan los genes CHRNA4, CHRNB2; en la epilepsia generalizada con convulsiones febriles está mutado el canal de Na⁺, en la subunidad sensora de voltaje o en el receptor de GABA_A, los genes mutados son SCN1B, SCN1A, GABRG2; en la ataxia episódica el canal afectado es de K⁺ gatillado por voltaje, el gen mutado es KCNA1; en la convulsión neonatal familiar benigna, los genes mutados son KCNQ2 y KCNQ3 (Lerche et al., 2001).

En el humano se han encontrado alrededor de 70 genes para canales de K⁺, pero solo algunos han sido ligados a enfermedades. La familia de canales KCNQ está formada por KCNQ 1, 2, 3, 4 y 5; y mutaciones en cuatro de ellos producen enfermedades que incluyen arritmias cardíacas, sordera y epilepsia (Jentsch, 2000). Los canales asociados a la enfermedad que interesa en este trabajo son los KCNQ2 y KCNQ3.

Específicamente, en la convulsión neonatal familiar benigna se han reportado diferentes tipos de mutaciones. Se localizan principalmente a dos niveles: (1) en el gen KCNQ2 en el cromosoma 20q13.3 y (2) en el gen KCNQ3 en el cromosoma 8q24 (Biervert y Steinlein, 1999). Los cambios en el canal se muestran en la figura 25; se puede observar que las modificaciones (empalmes, inserciones y deleciones) se localizan en el poro y en el asa del carbono terminal. Estos cambios reducen la corriente máxima de iones acarreados por los canales de tipo-M, sin afectar la selectividad iónica o las propiedades de gatilleo. La sustitución de arginina por triptófano en el dominio S4, que es sensitivo al voltaje, en la subunidad KCNQ2 (R214W) produce cambios en la cinética del canal (Figura 26): una apertura más lenta y un cierre más rápido (Castaldo et al., 2002).

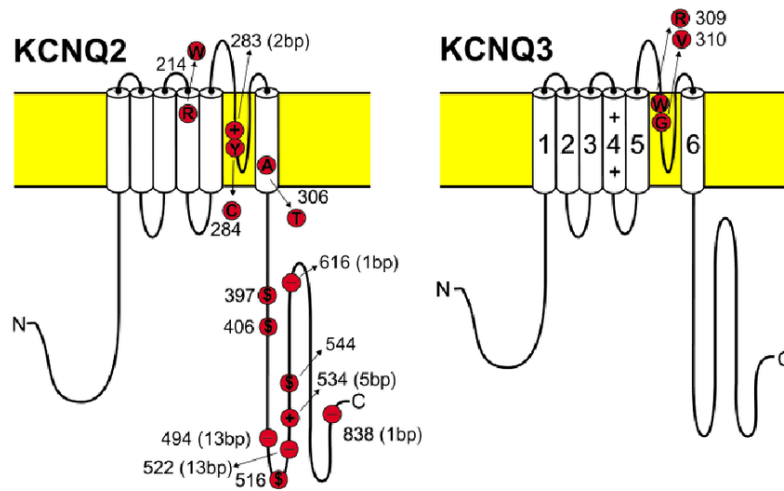


Fig.25. Esquema de los canales de K⁺: a la izquierda KCNQ2 y a la derecha KCNQ3. Los círculos (+, inserción; -, deleción y S, procesamiento "splice") indican las mutaciones encontradas en las convulsiones neonatales familiares benignas (modificado de Lerche et al., 2001).

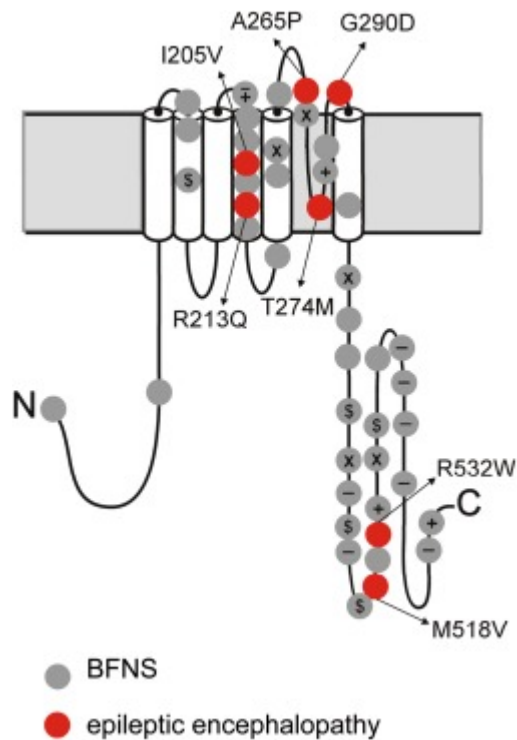


Fig. 26. Esquema que muestra las mutaciones en KCNQ2 implicados en las epilepsias genéticas. Los grupos de genes están representados en diferentes colores. BFNS lugares mutados en las convulsiones neonatales familiares benignas (Oyryer et al., 2017)

1.9 Los modelos matemáticos en las corrientes iónicas

Una manera de comprender los mecanismos de la generación de potenciales de acción es el uso de modelos matemáticos. Los primeros en desarrollar esta tarea fueron Hodgkin y Huxley (1952). Estos autores construyeron un modelo de tipo fenomenológico: cada resultado experimental y su análisis matemático permitió la determinación de variables como la conductancia máxima, las compuertas de apertura y cierre y sus velocidades. Con el modelo matemático resultante predijeron la existencia de sensores de voltaje en las proteínas por donde pasaban los iones de Na^+ y K^+ de manera selectiva. Sugiriendo la existencia de canales iónicos, mismos que fueron descubiertos posteriormente. Con el paso de los años, estos modelos han sufrido modificaciones, he incluso se han simplificado. Varios autores han realizado este tipo de estrategia para generar trenes de potenciales de acción (Ermentrout y Kopell, 1986; Abbott y Kepler, 1990; Destexhe, 1997; Kistler et al, 1997; Richardson et al., 2003; Fourcaud-Trocmé et al., 2003; Gerstner y Kistler, 2002; Izhikevich, 2007). Sin embargo, estas estrategias, de reducción, no predicen el efecto de los parámetros (parámetros fisiológicos), como si lo hace un modelo detallado.

A un modelo detallado se le puede agregar más corrientes iónicas y estudiar su efecto. Por ejemplo, la I_M y la I_{AHP} han sido modeladas para reproducir el fenómeno de adaptación en el tren de PA (Kobayashi y Kitano, 2016). La figura 27, muestra la reproducción de estos modelos. Se presenta el caso de no adaptación, el caso cuando se aplica I_M y el caso cuando se aplica I_{AHP} .

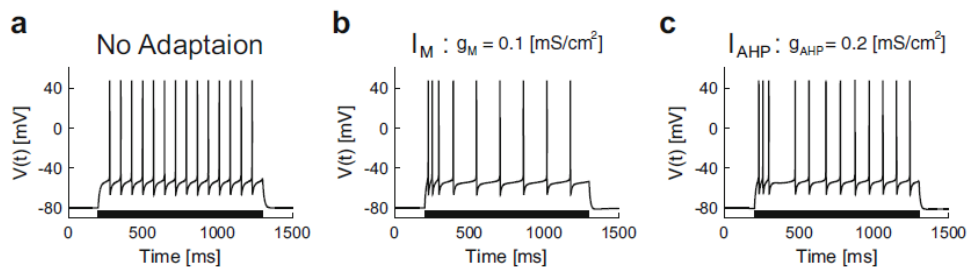


Fig. 27. Simulaciones de neurona de corteza con un modelo detallado. (a) generación de espigas sin adaptación. (b) simulación con adaptación debida a la corriente I_M con una conductancia de 0.1 mS/cm^2 . (c) adaptación debida a la corriente I_{AHP} con una conductancia de 0.2 mS/cm^2 .

2. ANTECEDENTES

2.1 Simuladores de la corriente de potasio tipo-M en el Internet

Selyanco y Brown en 1999 realizaron un trabajo en el cual simularon la actividad del canal tipo-M, para esto utilizaron el programa CSIM (versión 2.0, axón Instruments) al buscar el programa en la web se encuentra una página llamada MOLECULAR DEVICES COMPANY la cual se encarga de proveer amplificadores, digitalizadores, softwares y más material para la realización de patch-clamp, voltaje-clamp y current-clamp. Al ingresar a la página (<https://www.moleculardevices.com/systems/axon-conventional-patch-clamp/pclamp-11-software-suite>) se muestra su versión más reciente pCLAMP 11 Software Suite. Cabe mencionar que la versión utilizada por Selyanco y Brown ya no se encuentra en la página.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que las neurociencias son primordialmente experimentales, actualmente, su enseñanza en el mundo ha cambiado. Los simuladores han resultado de suma utilidad por dos razones principales: (1) los altos costos que implica la implementación de prácticas de laboratorio y (2) el uso indiscriminado de animales para este propósito. A nivel licenciatura estos factores se agravan por el alto número de alumnos en los cursos. En Internet existen varios simuladores para la neurociencias como son VCell, NEURON o GENESIS. Se puede definir a este tipo de simuladores como de propósitos generales, es decir, tienen la potencialidad de simular cualquier neurona y canales iónicos implicados, siempre y cuando se cuente con los datos anatómicos y electrofisiológicos del caso. Generalmente, su principal uso es de investigación, aunque algunos autores han desarrollado módulos limitados para la enseñanza. En cualquier caso, el aprendizaje de estos programas requiere cierto tiempo que rebasa el tiempo destinado a un curso de biofísica en la licenciatura. Una alternativa es diseñar simuladores con un alcance menor, que traten un solo tema a la vez, de manera que el tiempo de aprendizaje para su uso sea de solamente algunos minutos. Basados en esta estrategia de

enseñanza-aprendizaje, en este trabajo se diseñó y desarrolló un simulador de la electrofisiología del canal de potasio tipo-M.

4. OBJETIVO GENERAL

Diseñar y desarrollar un simulador de la corriente de K^+ tipo-M que permita demostrar la utilidad de la biofísica en un proceso de señalización neuronal normal comparada con un proceso de señalización neuronal patológica en la convulsión neonatal familiar benigna; como un ejemplo del uso de un modelo matemático y computacional en un proceso real.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desarrollar un módulo interactivo para introducir al usuario al tema de la enfermedad de convulsiones neonatales familiares benignas, la estructura molecular y electrofisiología del canal de K^+ tipo-M.

Desarrollar un simulador para la enseñanza-aprendizaje de la electrofisiología de neuronas de hipocampo en pacientes con convulsión neonatal familiar benigna.

Desarrollar un simulador para la enseñanza-aprendizaje de la regulación de la excitabilidad neuronal debido a la corriente de potasio tipo-M.

Desarrollar un simulador de la corriente iónica producto del canal de K^+ tipo-M en pacientes neonatales normales.

6. MATERIAL Y MÉTODO

Se diseñó y desarrolló un programa interactivo para la enseñanza-aprendizaje de la implicación del canal de potasio tipo-M en pacientes que presentan la enfermedad de convulsiones neonatales familiares benignas. El programa lleva por nombre “Convulsionar-CNFB” versión 1.0 y se divide básicamente en un menú de lecciones que incluye 8 temas, un menú de simuladores que incluye tres

simuladores y una sección que muestra el modelo matemático y las ecuaciones que se utilizaron en esta primera versión del programa. El programa fue escrito en lenguaje Visual Basic® versión 6.0 para ambiente Windows® con una resolución de color verdadero y que es ejecutable en Windows desde XP a Windows 10.

6.1 Metodología del leccionario

El menú de lecciones incluye ocho temas cada uno de ellos cuentan con una imagen, un cuadro de información sobre el tema y botones que sirven para ir a la siguiente lección, regresar al menú de lecciones o salir del programa.

Para la realización de este leccionario primero se buscaron las imágenes que servirían de apoyo visual y que fueran de acorde a la información que se presenta en cada pantalla, dichas imágenes fueron después realizadas a mano alzada, coloreadas y finalmente editadas computacionalmente. Después se seleccionó la información que aparecería en cada pantalla teniendo en cuenta que dicha información fuera clara y concisa. Finalmente se hizo uso del programa Visual Basic versión 6.0 para llevar a cabo el diseño de cada pantalla del leccionario, que incluía siempre un color de fondo, un encabezado, un menú en la parte superior de la pantalla, y los botones que servirían de enlace con otras interfaces del programa mediante el uso de comandos específicos para cada acción.

6.2 Modelo matemático

El modelo matemático para el tren de disparo de potenciales de acción en pacientes enfermos está basado en el modelo de Hodgkin y Huxley de 1952. El sistema de ecuaciones se derivó de un modelo eléctrico donde cada canal está representado por una resistencia eléctrica variable unida en serie a una batería que representa la diferencia de concentración del ion entre el medio extracelular e intracelular. La figura 28, muestra el modelo eléctrico correspondiente.

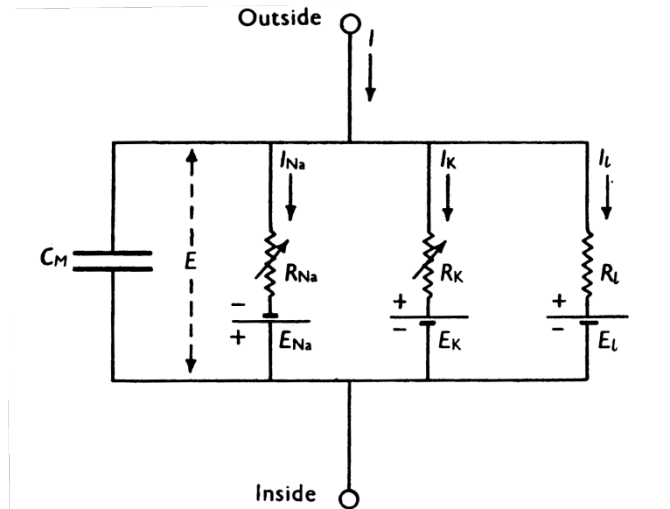


Fig. 28. Modelo eléctrico de las propiedades activas de la neurona. Las resistencias cruzadas con una flecha corresponden a los canales de Na^+ y de K^+ , los cuales se abren o cierran dependiendo del voltaje. Las pilas conectadas en serie con estas resistencias corresponden al potencial debido a la diferencia de concentración del ion. R_L corresponde a la resistencia de fuga; se le considera constante y el capacitor son los fosfolípidos en la membrana.

Las ecuaciones diferenciales del modelo deben ser resueltas simultáneamente (Ecuaciones 1 a xx).

$$C \frac{dV}{dt} = g_{Na} m^3 h (V_{Na} - V) + g_K n^4 (V_K - V) + g_L (V_L - V) + I \quad (1)$$

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m(V)(1 - m) - \beta_m(V)m \quad (2)$$

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h(V)(1 - h) - \beta_h(V)h \quad (3)$$

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n(V)(1 - n) - \beta_n(V)n \quad (4)$$

Dónde:

V = voltaje

C = capacitancia

g_{Na} = conductancia de sodio

g_K = conductancia de potasio

g_L = conductancia de fuga

V_{Na} = potencial de inversión del sodio

V_K = potencial de inversión del potasio

V_L = potencial de inversión de fuga

m, n y h compuertas de apertura e inactivación

I = corriente aplicada

Las constantes de velocidad (α_m , β_m , α_n , β_n , α_h y β_h) que se obtuvieron de los experimentos de Hodgkin y Huxley indican de alguna manera las velocidades de apertura, cierre o inactivación de los canales (Ecuaciones 5 a 10).

$$\alpha_m = \frac{0.1(V_m + 35.0)}{\left(1 - e^{\left(\frac{-(V_m + 35.0)}{10.0}\right)}\right)} \quad (5)$$

$$\beta_m = 4.0 e^{-(V_m + 60.0)/18.0} \quad (6)$$

$$\alpha_h = 0.07 e^{-(V_m + 60.0)/20.0} \quad (7)$$

$$\beta_h = 1. / (1 + e^{-(V_m + 30.0)/10.0}) \quad (8)$$

$$\alpha_n = 0.01(V_m + 50.0) / (1 - e^{-(V_m + 50.0)/10.0}) \quad (9)$$

$$\beta_n = 0.125 e^{\left(-\frac{V_m + 60.0}{80.0}\right)} \quad (10)$$

Para la generación de potenciales de acción en neonatos normales, al modelo de Hodgkin y Huxley (1952), se le agrega otra resistencia variable que significa el canal iónico tipo-M. Las ecuaciones diferenciales 11 a 15, lo representan y se suman al modelo de Hodgkin y Huxley.

$$I_T = I_{Cm} + I_M + I_{Na} + I_K + I_L \quad (11)$$

Dónde:

I_T = corriente total

I_{Cm} = corriente en el capacitor

I_M = corriente M

I_{Na} = corriente de Na

I_K = corriente de K

I_L = corriente de fuga

Para el caso específico de I_M :

$$I_M = G_M(V_M - V) \quad (12)$$

Dónde:

V es el voltaje

V_M es el potencial de equilibrio para la corriente M

G_M es la conductancia del canal tipo-M y está dado por:

$$G_M = \hat{G}_M \left[1 + \exp \frac{ze}{kT} (V_o - V) \right]^{-1} \quad (13)$$

$$\left\{ \frac{\alpha_M}{\beta_M} \right\} = \left\{ \frac{\alpha_{M(0)}}{\beta_{M(0)}} \right\} \exp \left\{ \frac{+}{-} \right\} \left[\frac{ze}{2kT} (V - V_o) \right] \quad (14)$$

$$\tau_M = (\alpha_M + \beta_M)^{-1} \quad (15)$$

Dónde:

$\hat{G}_M$ es la conductancia máxima obtenida cuando el mayor porcentaje de los canales tipo-M están abiertos

z es la valencia aparente del sensor de voltaje

V_o es el potencial de membrana para la mitad de los canales en estado abierto

α_M es la constante de velocidad de apertura del canal

β_M es la constante de velocidad de cierre del canal

7. RESULTADOS

Inicialmente, al abrir el simulador aparece la pantalla de “MENÚ PRINCIPAL” donde se localizan tres botones para acceder a: un “MENÚ DE LECCIONES”, un menú de “SIMULADORES”, y al “MODELO MATEMÁTICO” utilizado para simular la actividad del canal de K^+ tipo-M. En la figura 29, se muestra además un cuarto botón para “SALIR” del programa.

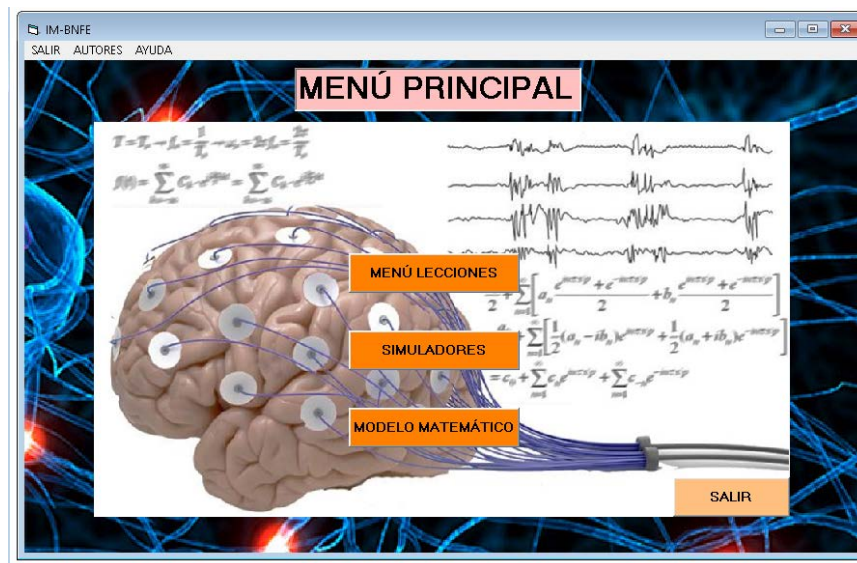


Fig. 29. Interfaz con el menú principal del programa. Se localiza también una barra de menú en la parte superior de la pantalla para salir, autores y un menú de ayuda.

7.1 Módulo de lecciones

Como parte de una introducción al tema de la corriente de K^+ tipo-M se incluyó un módulo de lecciones que se muestra en la figura 30. En esta pantalla el usuario puede visualizar un menú de lecciones que incluye información sobre los síndromes epilépticos, la epilepsia neonatal familiar benigna, cómo se produce dicha enfermedad, los canales de K^+ , las mutaciones que presenta el canal tipo-M y sobre la corriente de K^+ tipo-M, entre otras.



Fig. 30. En esta interfaz el usuario puede acceder a cada una de las lecciones que desee conocer. Con los últimos botones de color naranja el usuario puede regresar al menú principal o salir del programa.

En la figura 31, se muestra la primera lección sobre el tema de este trabajo, donde el usuario tendrá acceso a una breve descripción sobre qué son los síndromes epilépticos y en qué consisten. Se muestra también una imagen de un neonato con CNFB. En la barra superior muestra: autores, ayuda y salir.



Fig. 31. En esta interfaz se muestra información sobre los síndromes epilépticos.

Se encuentran botones para regresar al menú de lecciones, ir a la siguiente lección o salir del programa.

Continuando con las ventanas del módulo de lecciones se muestra en la figura 32 una pantalla donde el usuario encontrará información más detallada sobre la CNFB, así como un poco de su historia. Desde esta pantalla el usuario podrá acceder a la siguiente lección o en su caso volver al “MENÚ DE LECCIONES” o “SALIR” del programa. En la parte superior de la pantalla se encuentra un menú con “AYUDA”, “AUTORES” y “SALIR”.

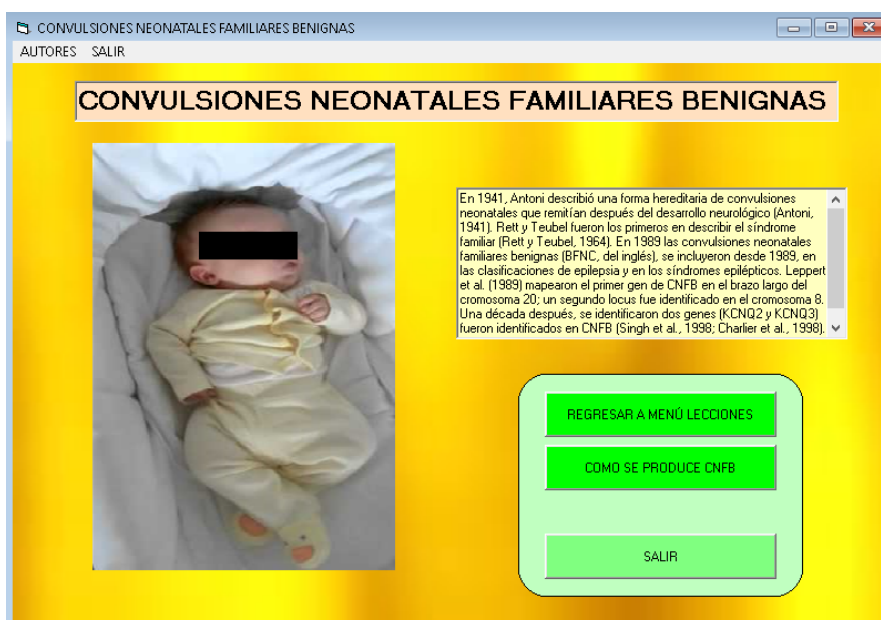


Fig. 32. Interfaz con lección detallada de la CNFB. El usuario puede volver a las lecciones, avanzar a la siguiente lección o salir del programa.

En la figura 33, se muestra otra pantalla donde el usuario encontrará información sobre cómo se produce la Convulsión Neonatal Familiar Benigna. Además encontrara un diagrama para complementar dicha información. También, se podrá regresar al “MENÚ DE LECCIONES”, avanzar a la siguiente lección o “SALIR” del programa.



Fig. 33. Interfaz con lección sobre cómo se produce la CNFB, el usuario puede salir del programa o avanzar a la siguiente lección si así lo desea.

En el menú de lecciones, se encuentra la lección sobre las “CANALOPATÍAS EPILEPTICAS”. En la figura 34, se muestra la pantalla donde se incluyó una tabla con las diferentes canalopatías epilépticas, así como el cromosoma, el gen y el canal que afectan dichas canalopatías, entre otros datos. El usuario puede “SALIR” del programa con el botón “SALIR” o con la barra de la parte superior donde también encuentra información sobre los “AUTORES”, y una guía de “AYUDA”.

CANALOPATÍAS EPILEPTICAS

Existe una gran diversidad de canales iónicos que son fundamentales en las funciones celulares. Se abren y cierran en respuesta a las señales eléctricas, mecánicas y químicas. Se tienen al menos tres tipos de canales: canales dependientes de voltaje, canales unidos a ligando y canales metabotrópicos. El actual interés en el estudio de estos canales se fundamenta por presencia de ciertas alteraciones hereditarias o adquiridas, llamadas canalopatías, en las que el funcionamiento fisiológico de los canales está abolido o modificado (Cairizosa, 2011). Las canalopatías están involucradas en entidades clínicas muy variadas, como las miopatías hereditarias, ataxias episódicas, algunos tipos de epilepsias, síndrome del QT largo y la migraña hemipléjica.

Tipo	Siglas	Cromosoma	Gen	Canal	Receptor
Convulsiones neonatales familiares benignas	CNFB	20q13.2	KCNQ2	K ⁺	V-D
		8q24	KCNQ3	K ⁺	V-D
Epilepsia generalizada con CF plus	EGCF+	19q13.1	SCN1B	Na ⁺	V-D β_1
		2q24	SCN1A	Na ⁺	V-D α_1
Epilepsia frontal nocturna AD	EADNFL	20q13.2q13.3	CHRNA4	Na ⁺	Nicot alfa 4
		15q24	CHRNA3	Na ⁺	Nicot alfa 3
		1p21.1-q2	CHRB2	Na ⁺	Nicot beta 2

REGRESAR A MENÚ LECCIONES
CANALES DE K⁺
SALIR

Fig. 34. Interfaz con tabla de los tipos de canalopatías que existen e información sobre ellas. El usuario podrá acceder a la siguiente lección, salir del programa o volver al menú de lecciones.

El esquema típico de un canal de potasio se muestra en la figura 35. Aquí el usuario encontrara información general de los canales de potasio y podrá visualizar dos imágenes: una donde se dibujó un canal de potasio con sus cuatro subunidades, y su respectiva explicación. A esta pantalla se agregó un botón con la leyenda “SUBUNIDAD DEL CANAL DE K⁺”, que lleva a una interfaz donde se muestran estas subunidades. Cuando el usuario lo requiera podrá “SALIR” del programa, avanzar a la siguiente lección, o volver al “MENÚ LECCIONES”.

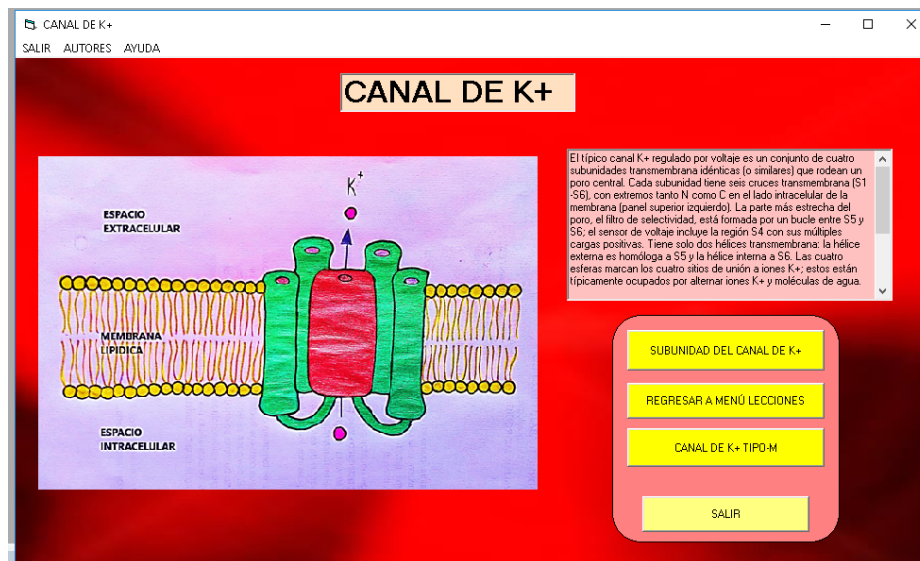


Fig. 35. Interfaz con información general sobre la estructura del canal de potasio y una imagen que ayuda a comprender mejor dicha información.

Una subunidad del canal de potasio tipo-M se muestra en la figura 36. En esta misma pantalla se localiza un menú superior en el que se encuentra una guía de “AYUDA”, para usar el programa.

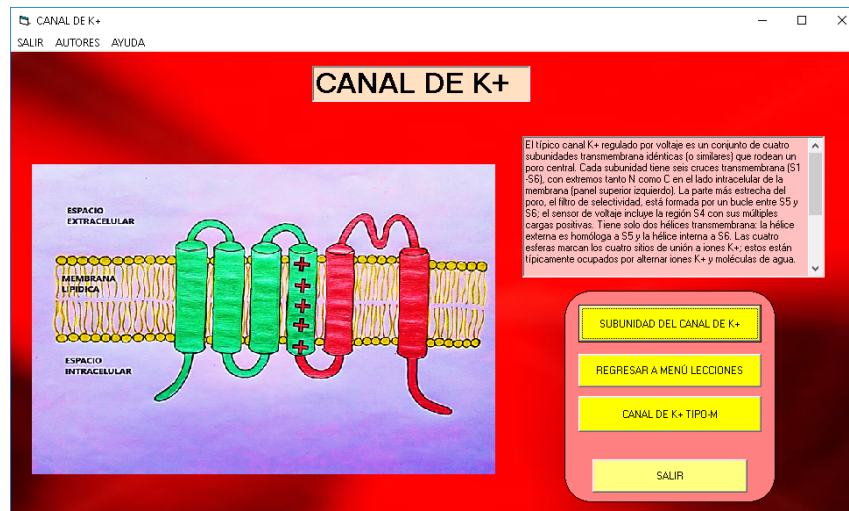


Fig. 36. En esta interfaz se visualiza la subunidad del canal de potasio y también cuenta con la barra de menú con autores, ayuda y salir.

La figura 37, corresponde a una pantalla en la que el usuario podrá encontrar una imagen del “CANAL TIPO-M” con sus subunidades Kv7.2 y Kv7.3, junto a esta se encuentra una descripción sobre la estructura tetramérica del canal tipo-M. El usuario podrá acceder a la siguiente lección desde esta pantalla o volver al “MENÚ DE LECCIONES”, así como “SALIR” del programa.

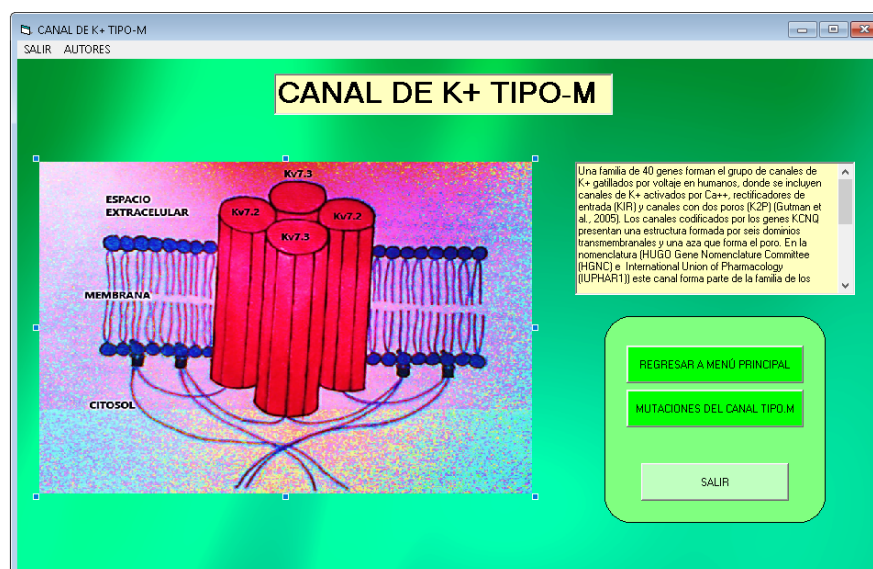


Fig. 37. En esta interfaz se muestran las subunidades Kv7.2 y Kv7.3.

Las mutaciones que se han encontrado en los dominios transmembrana del canal tipo-M se muestran en la figura 38. Se acompaña de información sobre estas mutaciones. De igual manera, se anexo un botón con la leyenda “CANAL KCNQ3” para cambiar de imagen. Si así lo desea el usuario podrá “SALIR” del programa, regresar al “MENÚ DE LECCIONES” o pasar a la siguiente lección.

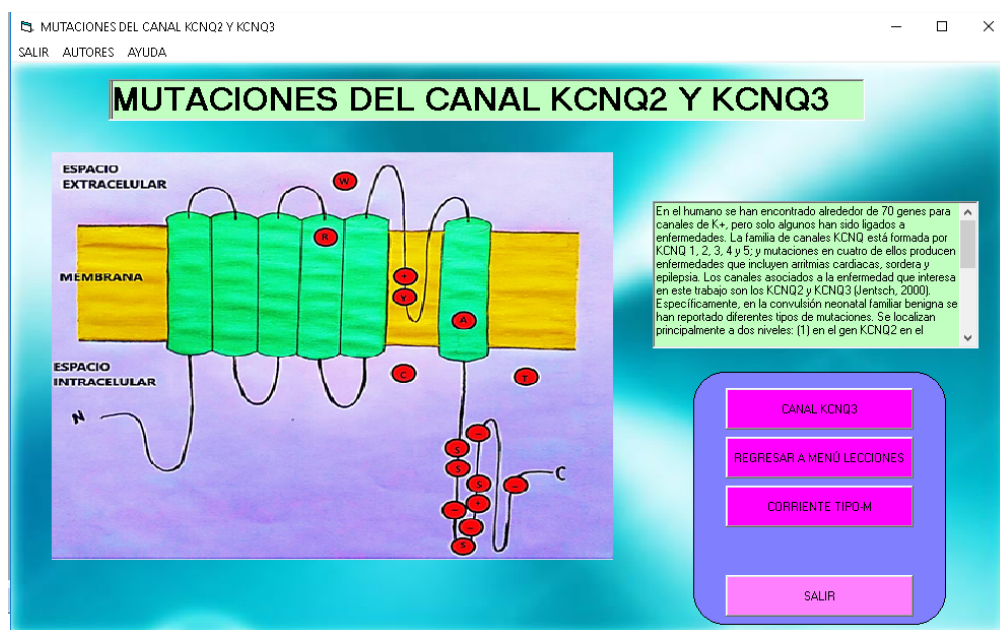


Fig. 38. En esta interfaz el usuario podrá analizar las mutaciones encontradas hasta ahora en el canal de potasio tipo-M, apoyándose de un recuadro con la información sobre estas mutaciones.

Las mutaciones del “CANAL KCNQ3” se muestran en la figura 39, con una ventana donde el usuario podrá acceder a la siguiente lección, “SALIR” del programa, o volver al “MENÚ DE LECCIONES”, también podrá consultar “AUTORES”, acceder a una guía de “AYUDA” o “SALIR” del programa con la barra de menú de la parte superior de la pantalla.

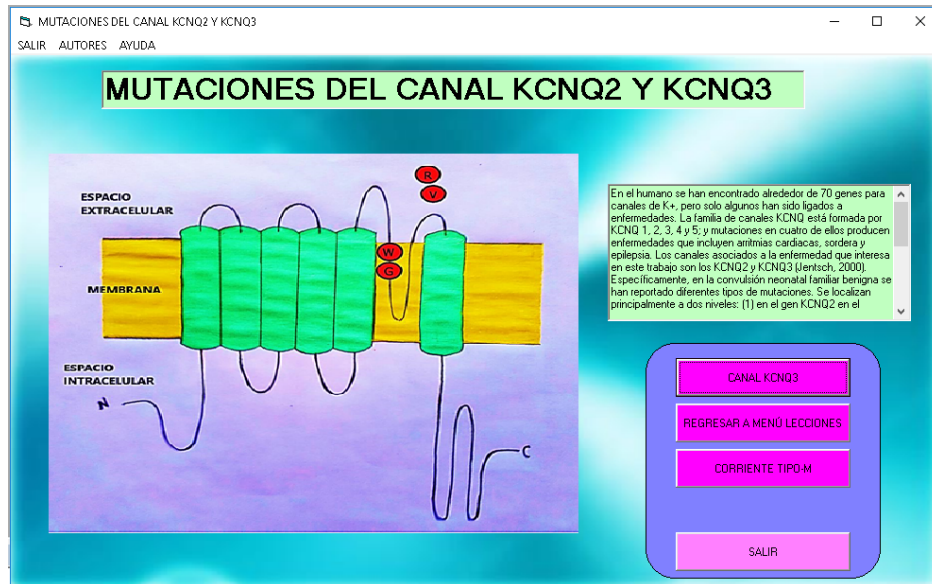


Fig. 39. Interfaz que muestra las mutaciones encontradas en el canal KCNQ3.

En la figura 40, se muestra una ventana donde el usuario podrá encontrar información de la “CORRIENTE TIPO-M”, acompañada de un dibujo en el cual se muestra un pulso de voltaje y la corriente que se produce haciendo una comparación de la corriente tipo-M en condiciones normales (izquierda) y la corriente-M inhibida (derecha). Se agregó un botón con la leyenda “POTENCIALES DE ACCION” la pantalla que este botón genera se encuentra en la figura 41.

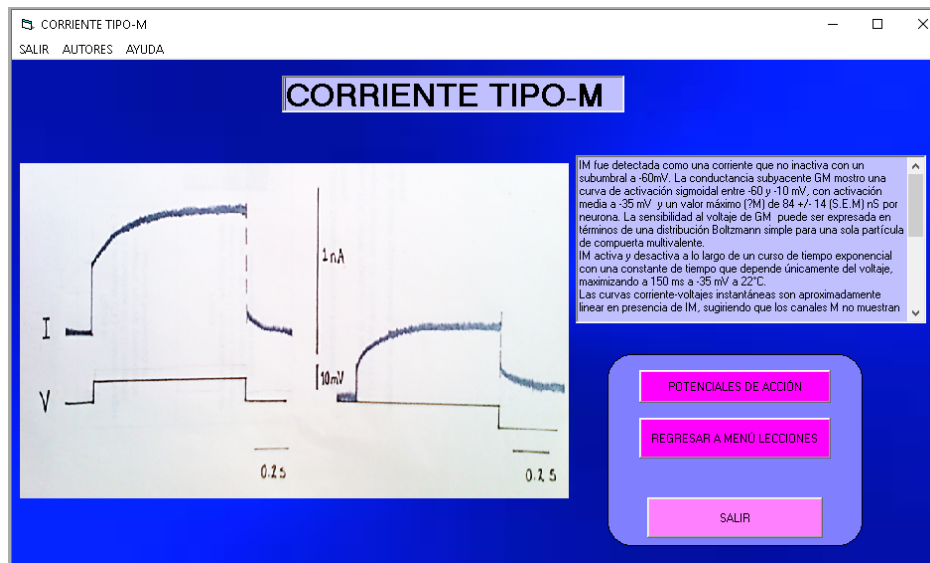


Figura 40. Interfaz con un dibujo que muestra la corriente que se genera durante un pulso de voltaje en condiciones normales (izquierda) e inhibida (derecha).

Los potenciales de acción que se generan durante un pulso de corriente se muestran en la figura 41, en esta pantalla el usuario podrá comparar el potencial de acción generado en condiciones normales y los potenciales de acción producidos durante la inhibición del canal de potasio tipo-M. En cualquier momento el usuario podrá “SALIR” del programa, avanzar a la siguiente lección o si es necesario volver al “MENÚ DE LECCIONES”.

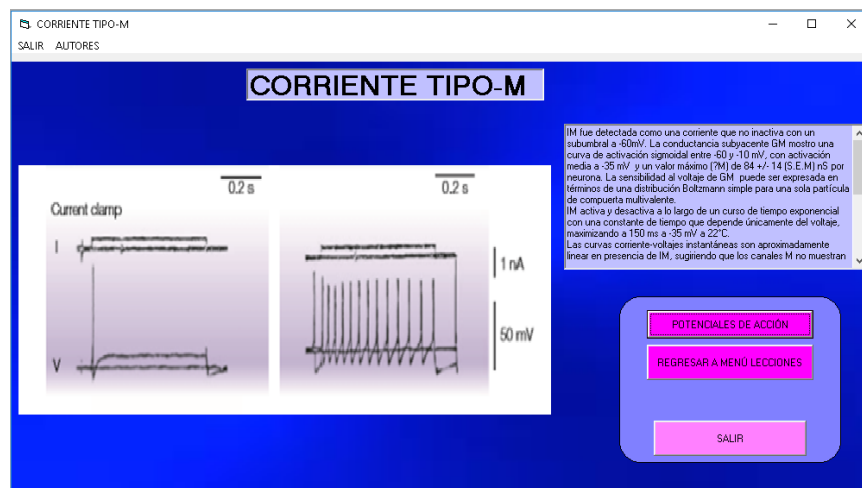


Fig. 41. Interfaz que muestra los potenciales de acción producidos por una inyección de corriente.

Finalmente, como parte importante del simulador realizado, se anexó un botón para que el usuario pueda conocer el “MODELO MATEMATICO” que se muestra en la figura 42. Para acceder a esta pantalla se debe ir al menú principal y pulsar el botón de “MODELO MATEMÁTICO”. En esta pantalla se observa el modelo eléctrico de Hodgkin y Huxley 1952, en esta imagen se le agregó una corriente tipo-M, en esta pantalla se encuentra un botón con la leyenda “ECUACIONES DE I_M ” el cual al ser pulsado desplegará una ventana que muestra las ecuaciones que se utilizaron en este trabajo, además se encuentra un botón para volver al “MENÚ PRINCIPAL” o para “SALIR” del programa.

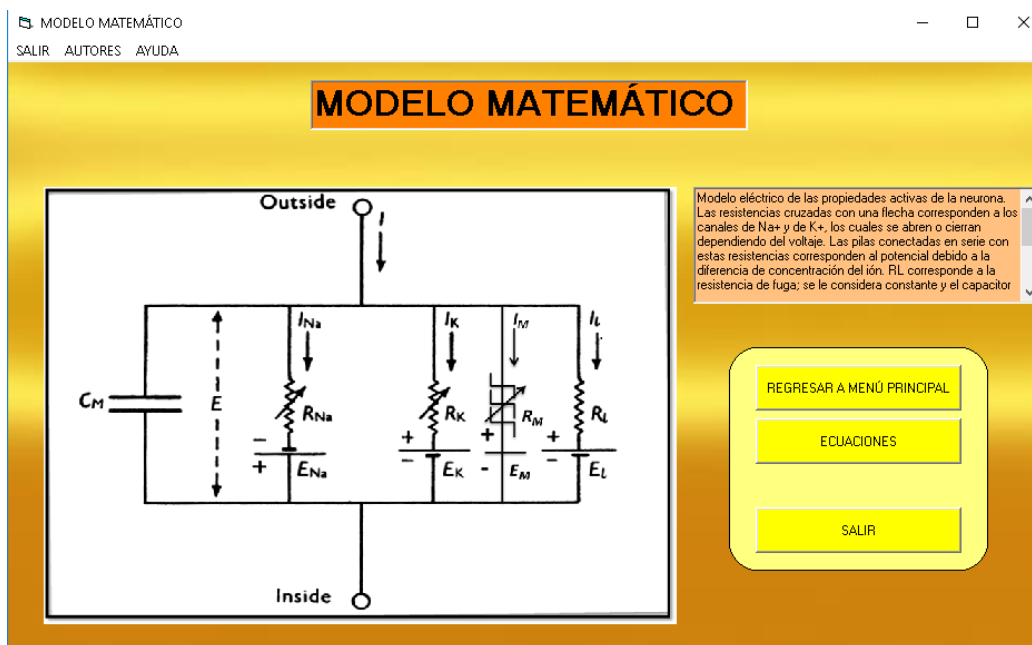


Fig. 42. Interfaz que muestra el modelo eléctrico desarrollado por Hodgkin y Huxley 1952, en la cual se incluyó la corriente de potasio tipo-M.

7.2 Módulo de simuladores

Se implementaron tres simuladores: (1) un simulador para reproducir los potenciales de acción en respuesta a un pulso de corriente, (2) un simulador para obtener la corriente producida durante un estímulo de voltaje, y (3) un simulador con dibujos que muestran a nivel molecular cómo funciona el canal de potasio tipo-M cuando la célula es sometida a pulsos de corriente. La ventana de esta interfaz con el “MENÚ DE SIMULADORES” se muestra en la figura 43.

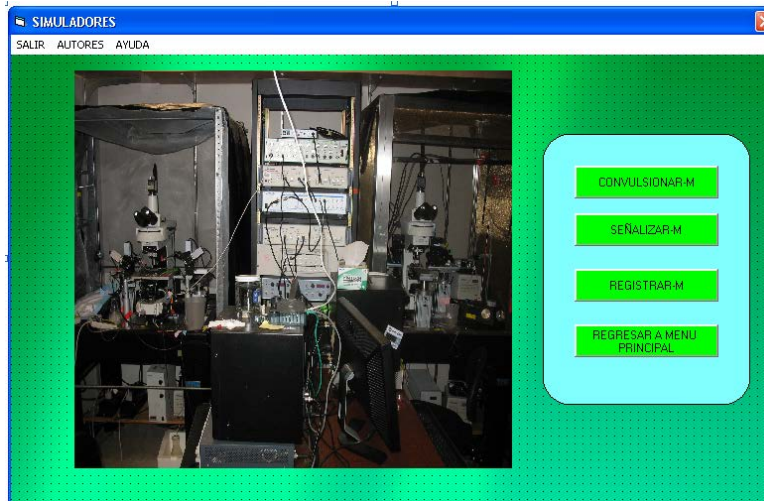


Fig. 43. Interfaz de usuario que muestra el menú principal para acceder a los simuladores.

7.2.1 Simulador “CONVULSIONAR-M”

La figura 44, corresponde al simulador denominado “CONVULSIONAR-M” en el cual se producen PA derivados de un estímulo de corriente. Esta ventana consta de tres compartimentos principales, el más grande de ellos se divide en dos osciloscopios en la parte superior se registra la corriente recibida por la neurona, en la parte inferior se muestra el trazo de los PA generados por el pulso de corriente que recibió la célula, Del lado derecho, se encuentra un segundo módulo más pequeño que contiene casillas para ingresar los valores del “ESTIMULO”; debajo de estas, se encuentran dos botones más; uno para simular la actividad del canal tipo-M en “PACIENTE CON CONVULSION NEONATAL FAMILIAR BENIGNA” y otro más para simular la actividad del canal tipo-M en “PACIENTES NORMALES”. También existe una casilla para ajustar el valor de la conductancia que se desee usar para la simulación. Finalmente, se localizan tres botones para “REGRESAR AL MENU SIMULADORES”, para “BORRAR” lo que se ha realizado hasta el momento y otro más para “SALIR” del programa.

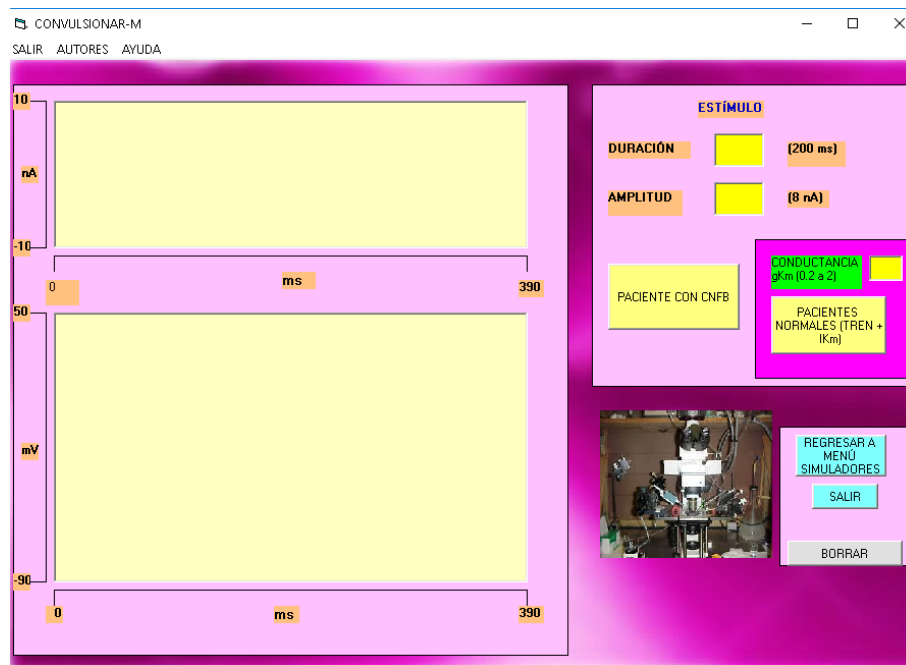


Fig. 44. Interfaz del simulador de potenciales de acción, se muestra del lado izquierdo los osciloscopios donde se registran los trazos de la corriente inyectada y los PA. Del lado derecho, el módulo de estímulo.

En la figura 45, se muestra el registro de los PA que se producen durante un estímulo de 200 ms y una amplitud de 8 nA, para pacientes con convulsión neonatal familiar benigna. En la parte superior, se muestra el trazo de corriente de estímulo. Si el usuario lo desea, puede regresar al “MENU DE SIMULADORES”, “BORRAR” los trazos registrados por el simulador o “SALIR” del programa.

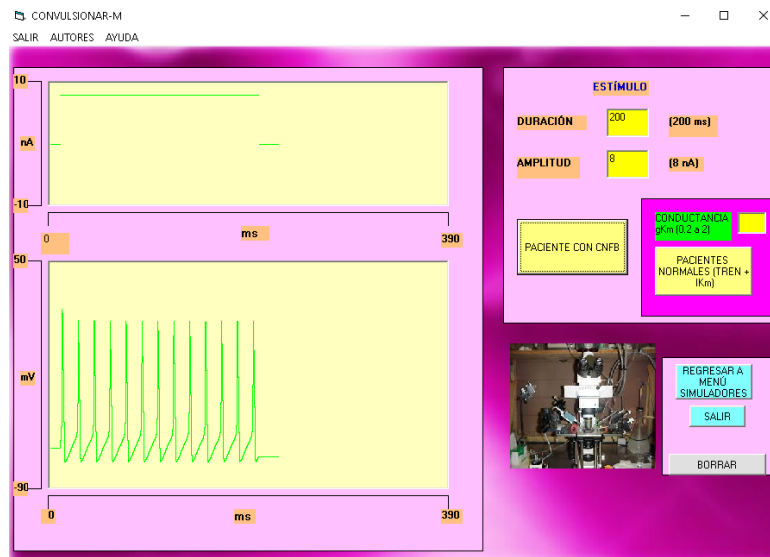


Fig. 45. Interfaz que muestra los potenciales de acción producidos durante un estímulo en pacientes con convulsión neonatal familiar benigna.

Como ejemplo de uso, se estimula a la neurona con un pulso, con una duración de 200 ms, una amplitud de 8 nA, y un valor de conductancia de 0.2. Con este valor, no se observa cambio como se demuestra en la figura 46.

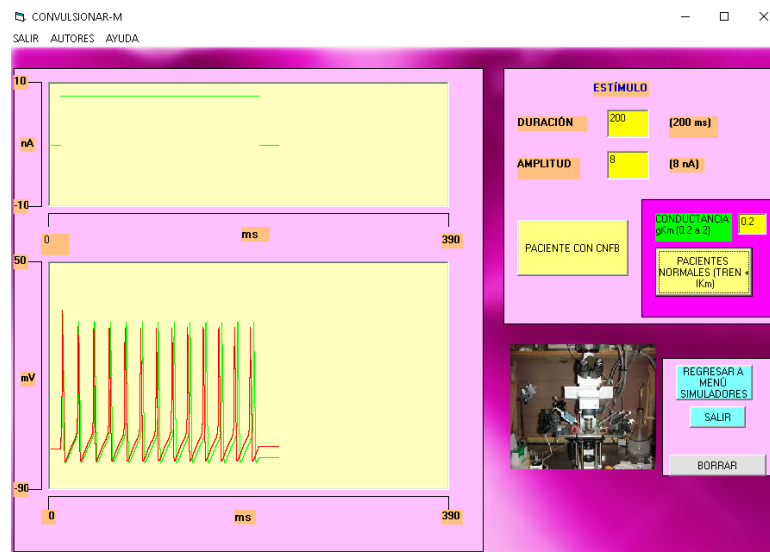


Fig. 46. Interfaz que muestra los trazos de potenciales de acción de pacientes normales y con una conductancia de 0.2 para el canal tipo-M.

En la figura 47, se muestran los PA generados en pacientes con CNFB (verde) y en pacientes normales (rojo). El estímulo fue de 8 nA de amplitud y 200 ms de

duración. Se observa una disminución en el número de potenciales conforme se incrementa la conductancia de los canales de K^+ tipo-M. Conforme se aumenta la corriente el potencial de membrana tiende a irse al reposo y a alejarse del umbral de disparo. En consecuencia, en pacientes normales las neuronas de hipocampo o de la corteza “frenan” los PA. En la convulsión neonatal familiar benigna, la unión de la acetilcolina al receptor muscarínico cierra los canales y el PM alcanza el umbral de disparo. Se producen ráfagas de PA y el neonato convulsiona.

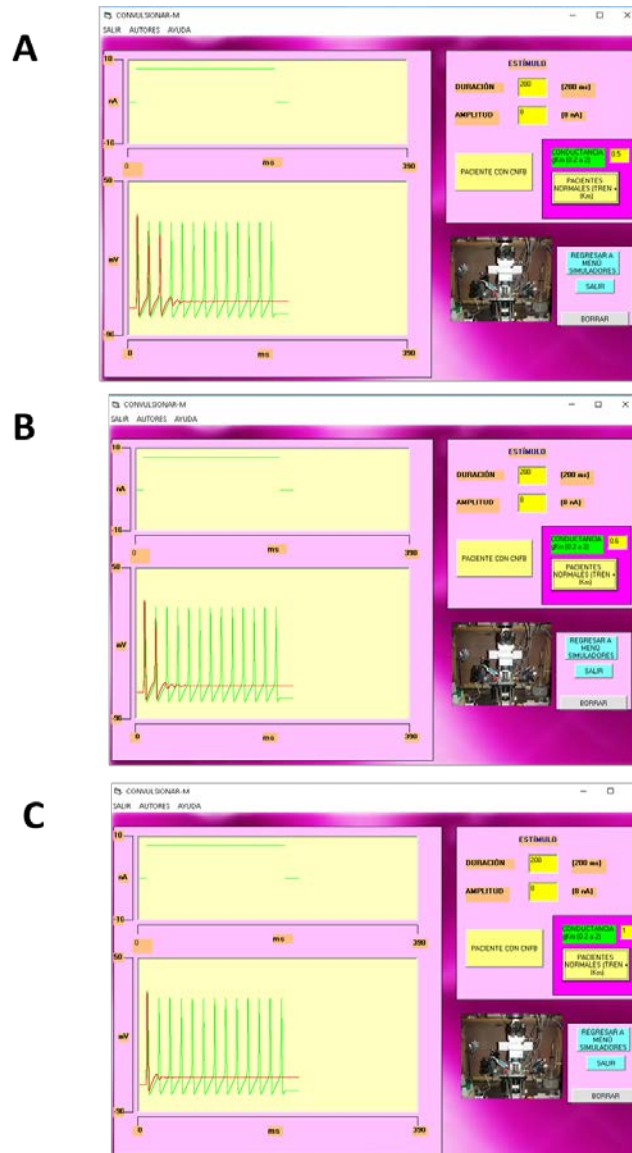


Fig. 47. Interfaz que muestra la disminución del número de PA en pacientes normales. (A) El valor para la conductancia del canal tipo-M fue de 0.5 nS/cm^2 , (B) simulación con $gK^+ = 0.6 \text{ nS/cm}^2$, (C) simulación con $gK^+ = 1 \text{ nS/cm}^2$. La neurona ha disminuido su excitabilidad.

7.2.2 Simulador “ SEÑALIZAR-M”

Se realizó un segundo simulador en el cual se muestran los procesos que ocurren a nivel celular debido a la unión de la acetilcolina al receptor M1. En la figura 48, se muestra la pantalla de inicio de este simulador. Esta pantalla se encuentra un solo osciloscopio en el cual se observaran los registros de los PA, cuenta también con un boton azul grande para acceder a la simulación “CONDICIONES INICIALES”. Aquí se define condiciones iniciales como el registro intracelular de una neurona (por ejemplo, de la corteza cerebral o del hipocampo) con el receptor-M sin agonista. El botón “RESTABLECER” permite al usuario volver a iniciar con el proceso de simulación sin tener que regresar al “MENÚ SIMULADORES”.

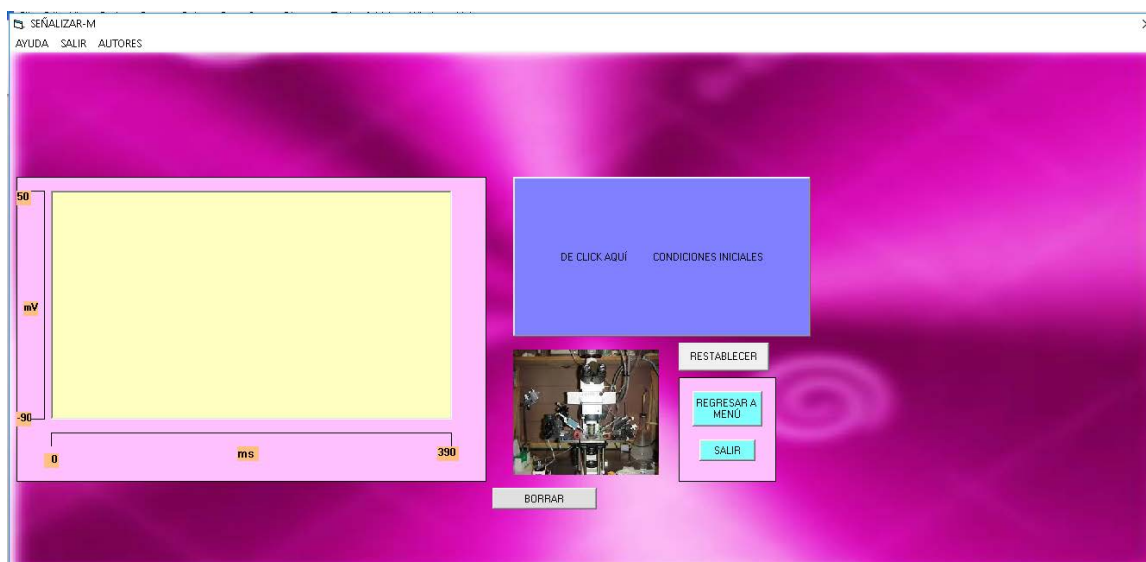


Fig. 48. Interfaz que muestra la ventana de inicio del simulador. Con el botón “condiciones iniciales” se ingresa al simulador.

La figura 49, muestra la interfaz del simulador. Aquí se muestra una imagen con el receptor M1 unido a la proteína $G\alpha_{q11}$ y el canal tipo-M unido a PIP_2 . Las concentraciones altas de PIP_2 unido al canal (canal fosforilado) lo mantienen abierto. Recientes investigaciones sugieren que los niveles de PIP_2 en membrana y unido al canal juegan un papel importante en la apertura o cierre del canal tipo-M: altas concentraciones lo mantienen abierto; bajas concentraciones lo cierran.

Cuando el receptor-M está libre, el canal de K⁺ tipo-M está fosforilado y abierto. En estas condiciones (iniciales) en el simulador al estimular la neurona con un pulso de corriente de 200 ms de duración y 8 nA de amplitud se generan solamente algunos PA e inmediatamente la corriente de K⁺ saliente por el canal-M tiende a repolarizar la neurona y cesan los PA (figura 49, ver osciloscopio). En esta interfaz también se muestra una pequeña explicación de la imagen que aparece.

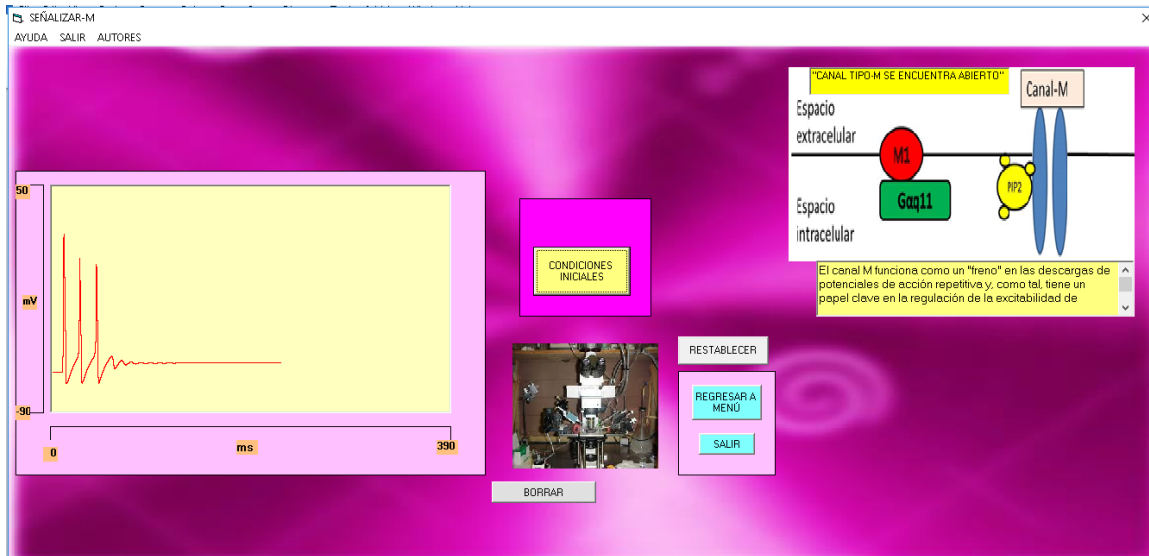


Fig. 49. Interfaz que muestra la imagen de las condiciones iniciales. El canal tipo-M está abierto. El receptor-M está libre. La excitabilidad de la neurona está disminuida y los PA ya no se producen.

Al finalizar la simulación aparece en la ventana un botón de color verde “ACETILCOLINA”. Con este botón se accede al simulador para estudiar el efecto de la acetilcolina (Figura 50).

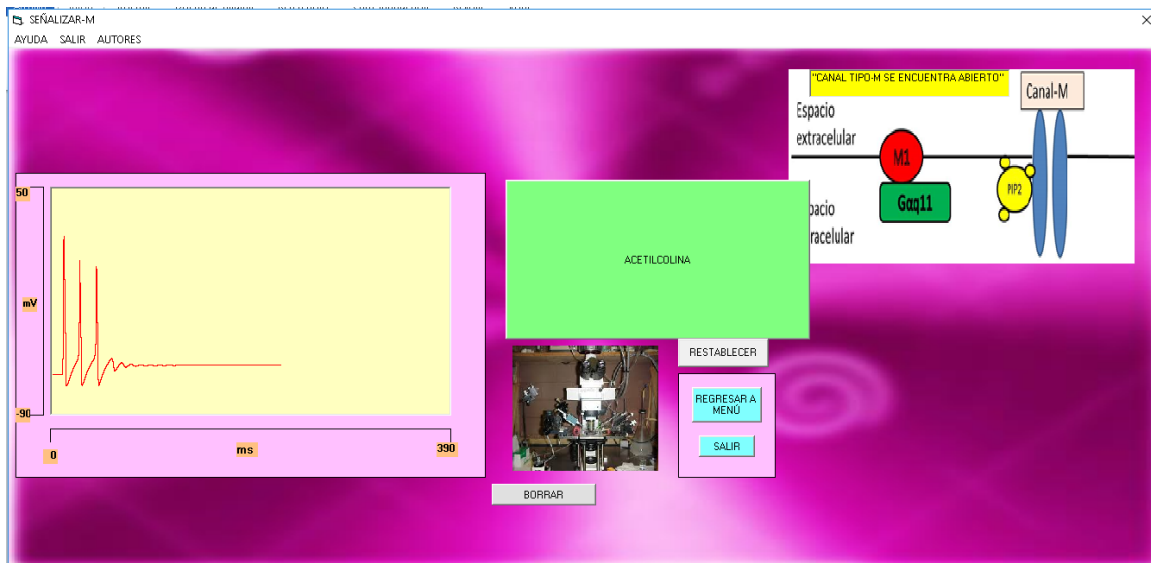


Fig. 50. Interfaz de transición. Con el botón “ACETILCOLINA” se accede al simulador propiamente dicho.

La pantalla que se abre al pulsar el botón verde “ACETILCOLINA” se muestra en la figura 51. En esta ventana aparece una imagen en la cual se muestran el receptor M1 unido a un agonista (en este caso el endógeno, acetilcolina) y a la proteína Gq11, al suceder esta unión se inicia una cascada de señalización que concluye con el cierre del canal tipo-M. Actualmente, se sabe que esta cascada de señalización disminuye la concentración de PI(4,5)P₂, como consecuencia se cierra el canal. Al cerrarse el canal tipo-M aumenta la excitabilidad de la neurona y se producen PA como parte de una respuesta a una señal. Al terminar la señal recibida la acetilcolina se disocia del receptor y nuevamente el canal queda abierto regulándose así su actividad.

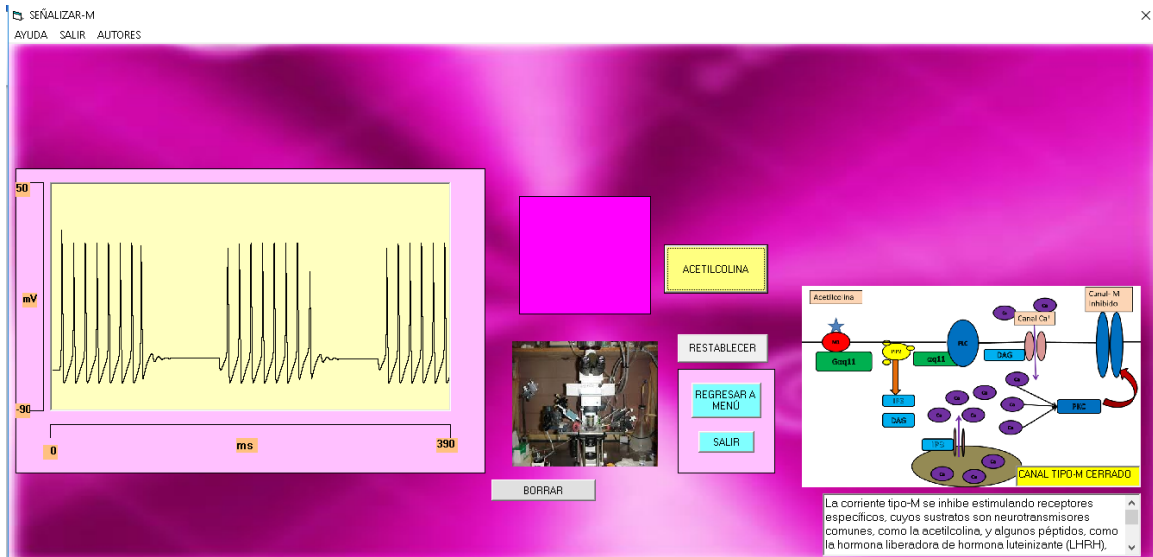


Fig. 51. Interfaz que muestra los disparos de potenciales de acción generados al activarse el receptor-M con la acetilcolina.

7.2.3 Simulador “REGISTRAR-M”

Para simular la corriente de K^+ tipo-M, se accede al simulador desde el menú principal de “simuladores”. La figura 52 muestra la interfaz correspondiente; consta de tres partes: del lado izquierdo, se encuentran dos osciloscopios, en la superior se registran los trazos de corriente –vs- tiempo; en la inferior, se registran los trazos del pulso de estímulo. Del lado derecho, se encuentran dos recuadros, el superior, para ingresar la amplitud del estímulo (-60 a 30 mV) y el inferior para la duración del estímulo (200-250 ms). Debajo de estos, se encuentra el botón “SIMULAR” para iniciar con la simulación. Finalmente, en la parte inferior derecha de la pantalla se localizan tres botones, en caso de que el usuario necesite “REGRESAR AL MENÚ”, “BORRAR” los trazos generados hasta el momento o “SALIR” del programa.

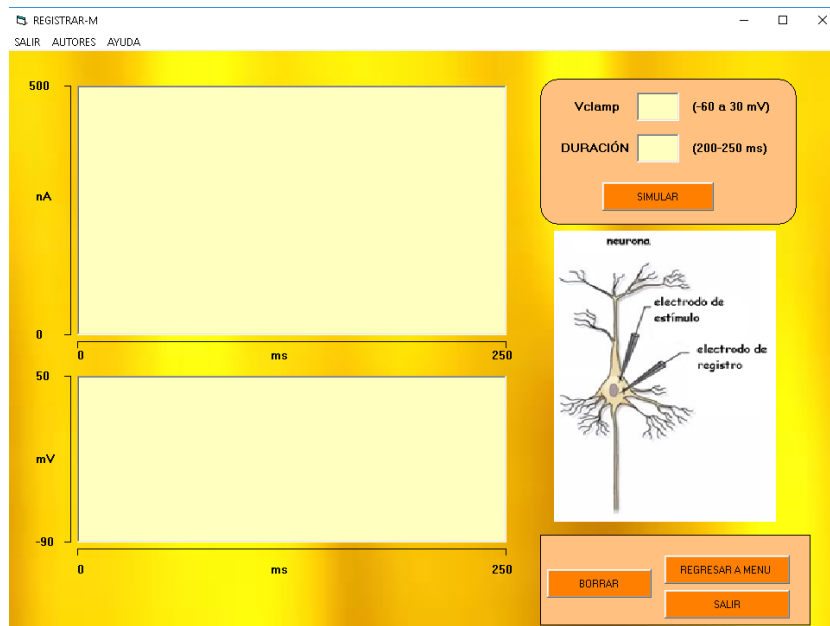


Fig. 52. Interfaz que muestra la ventana del simulador de la corriente tipo-M.

La figura 53, muestra la simulación de la corriente tipo-M generada con estímulo de fijación de voltaje de -60, -40, -20 y 10 mV, con una duración de 250 ms. El grafico inferior muestra los pulsos de voltaje que se han ido utilizados. Se observa una corriente saliente que no inactiva.

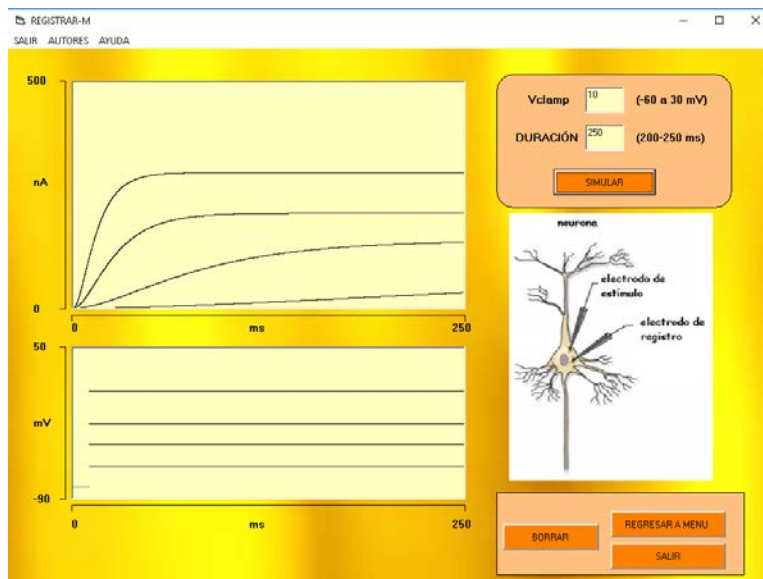


Fig. 53. Simulaciones con pulsos de fijación de voltaje desde -60 a 10 mV. La corriente se observa con claridad desde -40 mV, segundo trazo de abajo a arriba. A esos potenciales, la apertura del

canal, obliga a la salida de K^+ . La pérdida de cargas positivas produce una repolarización y el potencial de membrana tiende a regresar al reposo. La consecuencia es que la neurona no produce PA.

8. DISCUSIÓN

Después de la estimulación del receptor a muscarina; por ejemplo, con acetilcolina, se suprime la corriente de K^+ dependiente de voltaje de tipo-M. Para que esto suceda se tienen que coordinar la integración de tres señales intracelulares: (1) la calmodulina, (2) la proteína kinasa C (PKC) y (3) la depleción de $P(4,5)IP_2$ (Kosenko et al., 2012). El canal de K^+ tipo-M está formado por subunidades tetraheteroméricas que controlan la excitabilidad y la frecuencia de disparo de las neuronas. La mutación de los genes *KCNQ* producen condiciones neuropatológicas en la excitabilidad congénita y en la epilepsia incluyendo las convulsiones neonatales familiares benignas (Cooper y Jan, 1999; Jentsh, 2000, Miceli et al., 2013).

El mecanismo de interacción entre el receptor metabotrópico y el canal-M está actualmente bien estudiado. La activación del receptor acoplado a G_q activa la fosfolipasa C (PLC) que consume $P(4,5)IP_2$ disminuyéndolo. Un canal-M con deficiente $P(4,5)IP_2$, no puede conducir los iones K^+ . Otra vía es el mecanismo mediado por PKC que fosforila vía proteína ancorin kinasa-A (A-kinase anchoring protein, AKAP79/150) a la subunidad *KCNQ2* y reduce la eficacia de $P(4,5)IP_2$ (Kosenko et al., 2012; Suh y Hille, 2008; Hoshi, 2003).

Un anticonvulsivante que intervenga en estos mecanismos debe mantener abierto el canal tipo-M. Por ejemplo, Kay et al. (2015) demuestran que el ácido valproico (valproic acid) tiene su efecto anticonvulsivante preservando la corriente-M. Estos autores sostienen que la retigabina, un fármaco que apertura canales-M, tiene su efecto anticonvulsionante solamente cuando se administra después de inducir convulsiones en el ratón (Shah et al., 2013; Main et al., 2000). El ácido valproico tiene su efecto anticonvulsivante debido a la reducción de la palmitoilación de AKAP79/150 (Kay et al., 2015).

Los mecanismos para la regulación de la excitabilidad neuronal son de suma importancia para el funcionamiento del cerebro. El canal de K^+ tipo-M mantiene

baja la excitabilidad de la neurona siempre y cuando permanezca abierto. De manera general, cuando llega un neurotransmisor el canal se abre y aumenta la excitabilidad; como sucede en el canal de acetilcolina tipo nicotínico. En el caso de la corriente-M el neurotransmisor tiene como función final cerrar el canal-M.

En el curso de biofísica se estudian los canales dependientes de voltaje de Na^+ y K^+ clásicos, es decir los reportados por Hodgkin y Huxley en 1952. Con el simulador desarrollado en este trabajo, los alumnos aprenderán que existen otro tipo de canales dependientes de voltaje, pero que están asociados a un receptor que se encuentra distante del canal. Comprenderá que este tipo de receptores están asociados a una proteína G y que desencadenan cadenas de señalización cuya función final es cerrar el canal, en lugar de abrirlo. Además, el alumno podrá asociar cómo los aspectos teóricos y de experimentación básica contribuyen a una mayor comprensión de cómo la biofísica está implicada en aspectos de la vida y en la esperanza de un mejor tratamiento para ciertas enfermedades cerebrales, como es el caso de las convulsiones neonatales familiares benignas.

9. CONCLUSIONES

- Se diseñó y desarrolló un programa interactivo ejecutable en ambiente Windows® desde XP hasta Windows® 10.
- El programa permite acceder a un leccionario que introduce al usuario al tema.
- Cada lección está formada por un esquema y una explicación breve del tema
- El programa reproduce el comportamiento electrofisiológico de una neurona de hipocampo humano.
- La neurona simulada está formada por corrientes dependientes de voltaje tipo Hodgkin y Huxley (1952) y se le agregó una corriente de K^+ dependiente del voltaje y del tiempo tipo-M.

- En este simulador la presencia o ausencia de corriente tipo-M está determinada por el valor de la conductancia del canal.
- Se pueden realizar simulaciones de disminución o ausencia de corriente de K^+ tipo-M dependientes de la interacción ligando receptor.
- Con estas simulaciones el usuario comprenderá la importancia de la cascada de señalización en este canal metabotrópico.
- Con el programa se pueden realizar simulaciones que explican el aumento de excitabilidad neuronal ante una mutación del canal, de manera que se presenta la enfermedad de las convulsiones neonatales familiares benignas.
- Con el programa el usuario comprenderá la utilidad de la biofísica en un proceso real.

10. BIBLIOGRAFIA

Abbott, L., y Kepler, T. (1990). Model neurons: from Hodgkin Huxley to Hopfield. In L. Garrido (Ed.), Statistical Mechanics of Neural Networks. Berlin: Springer.

Acosta, G.E.I. (2013) La bradisinina incrementa una corriente de potasio tipo rectificador tardío en tiempo y forma, como lo hacen la angiotensina II y agonistas muscarínicos. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Colección Textos Universitarios.

Adams, P. R, Brown D. A, Constanti, A. (1982). Pharmacological inhibition of the m-current. J Physiol, Vol. 332, 223-262.

Adams, P.R, Brown, D.A, Constanti, A. (1982). M-current and other potassium currents in bullfrog sympathetic neurons. J Physiol, Vol. 330, Num. 1, 537-572

Adams, P.R, Brown, D.A. (1980). Luteinizing hormone-releasing factor and muscarinic agonists act on the same voltage-sensitive K⁺-current in bullfrog sympathetic neurons. Br J Pharmac, Vol. 68, 353-355.

Antoni, N. (1941). Aketenskapsförbudet för epileptiker bör upphävas åtminstone tills vidare. Svensk Läkartidningen; 38: 233-243.

Biervert, C., y Steinlein, O. K. (1999). Structural and mutational analysis of KCNQ2, the major gene locus for benign familial neonatal convulsions. Human Genetics, Vol. 104, 234-240.

Biervert, C., Schroeder, B.C., Kubisch, C., Berkovic, S.F., Propping, P., Jentsch, T.J. (1998). A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. Science, Vol. 279, 403-6.

Brown, D.A., Adams, P.R. (1980). Muscarinic suppression of novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neuron. Nature, Vol. 283, 673-675.

Brown, D. A. y Griffith, W. H. (1983) Persistent slow inward calcium current in voltage-clamped hippocampal neurons of the guinea-pig. J. Physiol, Vol. 337, 303-320.

Carriosa, M.J. (2011). Canalopatías epilépticas. Revista Chilena de Epilepsia. Vol. 11, Num. 1, 30-37.

Castaldo, P., del Giudice, E.M., Coppola, G., Pascotto, A., Annunziato, L., Taglialetela, M. (2002). Benign familial neonatal convulsions caused by altered gating of KCNQ2/KCNQ3 potassium channels. J Neurosci, Vol. 22, 1-6.

Caulfield, M.P. y Birdsall. N.J.M. (1998). International Union of Pharmacology. XVII. Classification of Muscarinic Acetylcholine Receptors. Pharmacological Reviews, Vol. 50, 279-90

Cherlier, C., Singh, N.A., Ryan, S.G., Lewis, T.B., Reus, B.E., Leach, R.J., Leppert, M. (1998). A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. Nature Genetics, Vol. 18, 53-55.

Cooper, E.C. y Jan, L.Y. (1999). Ion channel genes and human neurological disease: Recent progress, prospects, and challenges. Proc. Natl. Acad, Vol. 96, 4759–4766.

Cooper, E.C., Aldape, K.D., Abosch, A., Barbaro, N.M., Berger, M.S., Peacock, W.S., Jan, Y.N., Jan, L. Y. (2000). Colocalization and coassembly of two human brain M-type potassium channel subunits that are mutated in epilepsy. Proc Natl Acad Sci, Vol. 97, Num. 9, 4914–4919.

Delmas, P., Brown, D.A. (2005). Pathways modulating neural KCNQ/M Kv7 potassium channels. Nature reviews Neuroscience. Vol. 6, Num. 11, 850-862.

Destexhe, A. (1997). Conductance-Based Integrate-and-Fire Models. Neural Computation, Vol. 9, 503-514.

Devaux, J.J., Kleopa, K.A., Cooper, E.C., Scherer, S.S. (2004). KCNQ2 is a nodal K⁺ channel. J Neurosci, Vol. 24, 1236-1244.

Ermentrout, G.B., Kopell, N. (1986). Parabolic bursting in an excitable system coupled with a slow oscillation. SIAM J Appl Math, Vol. 46, 233-253.

Fourcaud-Trocmé, N., Hansel, D., van Vreeswijk, C., Brunel, N. (2003). How spike generation mechanisms determine the neuronal response to fluctuating inputs. *J Neurosci*, Vol. 23, 11628-11640.

Gerstner, W y Kistler, W.M. (2002). *Spiking Neuron Models Single Neurons, Populations, Plasticity*. University Press Cambridge.

Ghezzi, F., Corsini, S., Nistri, A. (2017). Electrophysiological characterization of the M-current in rat hypoglossal motoneurons. *Neuroscience*, Vol. 340, 62-75

Gunthorpe, M.J., Large, C.H., Sankar, R. (2012). The mechanism of action of retigabine (ezogabine), a first-in-class K⁺ channel opener for the treatment of epilepsy. *Epilepsia*, Vol. 53, Num. 3, 412–424.

Gutman, G.A., Chandy, K.J., Grissmer, S., Lazdunski, M., Mckinnon, D., Pardo, L.A., Robertson, G.A., Rudy, B., Sanguinetti, M.C., Stühmer, W., y Wang, X. (2005). International union of pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological reviews*, Vol. 57, Num. 4, 473-508.

Haga, T. (2013). Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, Vol. 89, Num. 6, 226-256.

Halliwel, J.V., Adams P. R. (1982). Voltage-Clamp Analysis of Muscarinic Excitation in Hippocampal Neurons. *Brain Research*, Vol. 250, 71-92

Hladik, J. (1982). *La biofísica*. Fondo de Cultura Económica.

Hodgkin, A.L. & Huxley, A.F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol*, Vol. 117, Num. 4, 500-544.

Horowitz, L.F., Hirdes, W., Suh, B.C., Hilgemann, D.W., Mackie, K., Hille, B. (2005). Phospholipase C in living cells: activation, inhibition, Ca^{2+} requirement, and regulation of M current. *J. Gen. Physiol*, Vol. 126, 243–62

Hoshi, N., Zhang, J.S., Omaki, M., Takeuchi, T., Yokoyama, S., Wanaverbecq, N., Langeberg, L.K., Yoneda, Y., Scott, J.D., Brown, D.A., Higashida H. (2003). AKAP150 signaling complex promotes suppression of the M-current by muscarinic agonists. *Nat Neuroscience*, Vol 6, Num 6, 564–571

Hulme, E. C., Birdsall, N. J. M., y Buckley, N. J. (1990). Muscarinic receptor subtypes. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, Vol. 30, 633-673.

Izhikevich, E. M. (2007). *Dynamical systems in neuroscience: the geometry of excitability and bursting*. Cambridge: MIT Press, London England.

Jentsch, T.J. (2000). Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Neuroscience*, Vol. 1, 21-30.

Jia, Q., Jia, Z., Zhao, Z., Liu, B., Liang, H., Zhang H. (2007). Activation of Epidermal Growth Factor Receptor Inhibits KCNQ2/3 Current through Two Distinct Pathways: Membrane PtdIns(4,5)P₂ Hydrolysis and Channel Phosphorylation. *The Journal of Neuroscience*, Vol. 27, Num.10, 2503-2512.

Jones, S., Brown, D.A., Milligan, G., Willer, E., Buckley, N.J., y Caufield, M.P. (1995). Bradykinin excites rat sympathetic neurons by inhibition of M-current through a mechanism involving B₂ receptors and G_{αq/11}. *Neuron*, Vol. 14, 399-405.

Kaczmarek, L. K., Levitan, I. V. (1987). What is neuromodulation. In: Neuromodulation. The biochemical control of neuronal excitability. Oxford University Press. USA, 3-16.

Kawaguchi, Y., y Kubota, Y. (1993). Correlation of physiological subgroupings of nonpyramidal cells with parvalbumin- and calbindin D28k-immunoreactive neurons in layer V of rat frontal cortex. J. Neurophysiol, Vol. 70, 387–396.

Kay, H.Y., Greene, D.L., Kang, S., Kosenko, S., Hoshi, N. (2015). M-current preservation contributes to anticonvulsant effects of valproic acid. The Journal of Clinical Investigation, Vol. 125, Num. 10, 3904-3914.

Klinger, F., Gould, G., Boehm, S., Shapiro, M.S. (2011). Distribution of M-channel subunits KCNQ2 and KCNQ3 in rat hippocampus. NeuroImage, Vol. 58, 761–769.

Kistler, W. M., Gerstner, W., y van Hemmen, J. L. (1997). Reduction of the Hodgkin-Huxley equations to a single-variable threshold model. Neural Comput, Vol. 9, 1015–1045.

Kobayashi, R., Kitano, K. (2016). Impact of slow K^+ currents on spike generation can be described by an adaptive threshold model. J Comput Neuroscience, Vol. 40, 347–362.

Kosenko, A., Kang, S., Smith, I.M., Greene, D.L., Langeber, L.K., Scott, J.D., Hoshi, N. (2012). Coordinated signal integration at the M-type potassium channel upon muscarinic stimulation. The EMBO Journal, Vol. 31, Num. 14, 3147–3156.

Leppert, M., Anderson, V.E., Quattlebaum, T., Stauffer, D., O’Connell, P., Nakamura, Y., Lalouel, J.M., White, R. (1989). Benign familial neonatal convulsions linked to genetic markers on chromosome 20. Nature, Vol. 337, 647-

Lerche, H., Jurkat-Rott, K., Lehmann-Horn, F. (2001). Ion Channels and Epilepsy. American Journal of Medical Genetics, Vol. 106, Num. 2, 146-159.

Madison, D.V., Nicoll, R.A. (1994). Control of the repetitive discharge of rat CA1 pyramidal neurons in vitro. J Physiol, Vol. 354, 319-331.

Main, M.J., Cryan, J. E., Dupere, J.R.B., Cox, B., Clare, J.J., Burbidge, S. A. (2000). Modulation of KCNQ2/3 Potassium Channels by the Novel Anticonvulsant Retigabine. Molecular pharmacology, Vol. 58, 253–262.

Maljevic, S., Wuttke, T.V., Lerche, H. (2008). Nervous system KV7 disorders: breakdown of a subthreshold brake. J Physiol, Vol. 586, 1791-1801.

Maljivec, S., Lerche, H. (2014). Potassium channel genes and bening familial neonatal epilepsy. Progress in brain research, Vol. 213, 17-53.

Miceli, F., Soldovieri, M.V., Ambrosino, P., Barrese, V., Migliore, M., Cilio, M.R., Taglialatela, M. (2013). Genotype–phenotype correlations in neonatal epilepsies caused by mutations in the voltage sensor of Kv7.2 potassium channel subunits. PNAS, Vol. 110, Num. 11, 4386–4391.

Nachmansohn, D. (1937). Choline esterase in the central nervous system. Nature, Vol. 140, 427

Nachmansohn, D. (1937). On the physiological significance of choline esterase. The Yale Journal of biology and medicine, Vol. 12, Num. 5, 565-589.

Oyrer, J., Maljevic, S., Scheffer, I.E., Berkovic, S.F., Petrou, S., Reid, C.A. (2017). Ion Channels in Genetic Epilepsy: From Genes and Mechanisms to Disease-Targeted Therapies Pharmacol Rev, Vol. 70, 142–173

Pfaffinger, P.J., Leibowitz, M.D., Subers, E.M., Nathanson, N.M., Almers, W., and Hille, B. (1988). Agonists that suppress M-current elicit phosphoinositide turnover and Ca^{2+} transients, but these events do not explain M-current suppression. *Neuron*, Vol. 1, 477-484.

Rett, A., Teubel, R. (1964). Neugeborenen-krämpfe im kahmen einer epileptisch belasteten familie. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 76: 609-613.

Rogawski M.A. (2000). KCNQ2/KCNQ3 K^+ channels and the molecular pathogenesis of epilepsy: implications for therapy. *Trends Neurosci*, Vol. 23, 393–398.

Rojas, C.V., Wang, J.Z., Schwartz, L.S., Hoffman, E.P., Powell, B.R., y Brown, R.H., Jr. (1991). A Met-to-Val mutation in the skeletal muscle Na^+ channel alpha-subunit in hyperkalaemic periodic paralysis. *Nature*, Vol. 354, 387–389.

Ronen, G. M., Rosales, T. O., Connolly, M., Anderson, V. E., Leppert, M. (1993). Seizure characteristics in chromosome 20 benign familial neonatal convulsions. *Neurology*, Vol. 43, 1355-60.

Rouse, S.T., Edmunds, S.M., Yi, H., Gilmor, M.L., Levey, A.I. (2000). Localization of M2 muscarinic acetylcholine receptor protein in cholinergic and non-cholinergic terminals in rat hippocampus. *Neuroscience Letters*, Vol. 284, 182-186.

Rundfeldt, C., Netzerb, R. (2000). The novel anticonvulsant retigabine activates M-currents in Chinese hamster ovary-cells tranfected with human KCNQ2/3 subunits. *Neuroscience Letters*, Vol. 282, 73-76

Richardson, M. J. E., Brunel, N., y Hakim, V. (2003) From subthreshold to firing-rate resonance. *J. Neurophisilol*, Vol. 89, 2438-2554

Saganich, M. J., Machado, E., Rudy, B. (2001). Differential expression of genes encoding subthreshold-operating voltage-gated K⁺ channels in brain. *J Neurosci*, Vol. 21, 4609–4624.

Schroeder, B.C., Kubisch, C., Stein, V., Jentsch, T.J. (1998). Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels causes epilepsy. *Nature*, Vol. 396, 687-90.

Schweitzer, P. (2000). Cannabinoids Decrease the K1 M-Current in Hippocampal CA1 Neurons. *The Journal of Neuroscience*, Vol. 20, Num. 1, 51–58

Selyanko, A.A., Brown, D.A. (1999). M-Channel Gating and Simulation. *Biophysical Journal* Vol. 77, 701–713.

Shah, M.M., Huang, Z., Martinello, K. (2013). HCN and KV7 (M-) channels as targets for epilepsy treatment. *Neuropharmacology*, Vol. 69, 75-81.

Shapiro, M.S., Wollmuth, L.P., y Hille, B. (1994a). Angiotensin II inhibits calcium and M current channels in rat sympathetic neurons via G-proteins. *Neuron*, Vol. 12, 1319-1329.

Shen, W., Hamilton, S. E., Nathanson, N. M., Surmeier, D. J. (2005). Cholinergic suppression of KCNQ channel currents enhances excitability of striatal medium spiny neurons. *J Neurosci*, Vol. 25, 7449–7458.

Singh, N.A., Charlier, C., Stauffer, D., DuPont, B.R., Leach, R.J., Melis, R. (1998). A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nature Genet*, Vol. 18, 25-29.

Solís, H., Hernández E.L. (2011). Canales de K⁺ tipo M y su relación con la canalopatía en la epileptogénesis. Arch Neurocién, Vol. 16, Num. 4, 200-208.

Soto, F., Torres, S. (2005). Estructura y función de los receptores acetilcolina de tipo muscarínico y nicotínico. Rev Mex Neurociencias, Vol. 6, Num. 4, 315-326.

Suh, B.C., Hille, B. (2002). Recovery from muscarinic modulation of M current channels requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis. Neuron, Vol. 35, 507-520.

Suh, B.C., Hille, B. (2007). Regulation of KCNQ channels by manipulation of phosphoinositides. J Physiol, Vol. 582, Num. 3, 911–916.

Suh, B.C., Hille, B. (2008). PIP₂ Is Necessary Cofactor for Ion Channel Function: How and Why?. Annu. Rev. Biophys, Vol. 37, 175–195.

Suh, B.C., Horowitz, L.F., Hirdes, W., Mackie, K., Hille, B. (2004). Regulation of KCNQ2 y KCNQ3 current by G protein cycling: the kinetics of receptor mediated signaling by Gq. J. Gen. Physiol, Vol. 123, 663-683.

Suh, B.C., Inoue, T., Meyer, T., Hille, B. (2006). Rapid chemically induced changes of PtdIns(4,5) P₂ gate KCNQ ion channels. Science, Vol. 314, 1454–57

Swartz, K.J. (2004). Towards a structural view of gating in potassium channels. Nat Rev Neurosci, Vol. 5, 905-916.

Takano, K., Yasufuku-Takano, J., Kozasa, T., Singer, W.D., Nakajima S., y Nakajima, Y. (1996). Gq/11 and PLC-beta 1 mediate the substance P-induced inhibition of an inward rectifier K⁺ channel in brain neurons. J. Neurophysiology, Vol. 76, Num. 3, 1-15

Telezhkin, V., Reilly, J.M., Thomas, A.M., Tinker, A., Brown D.A. (2012). Structural Requirements of Membrane Phospholipids for M-type Potassium Channel Activation and Binding. *The journal of biological chemistry*, Vol. 287, Num. 13, 10001–10012.

Tinel, N., Lauritzen, I., Chouabe, C., Lazdunski, L., Borsotto, M. (1998). The KCNQ2 potassium channel: splice variants, functional and developmental expression. Brain localization and comparison with KCNQ3. *Federation of European Biochemical Societies*, Vol. 438, 171-176.

Tokimasa, T., y Akasu, T. (1990). ATP regulates muscarine-sensitive potassium current in dissociated bull-frog primary afferent neurons. *J. Physiol*, Vol. 426, 241-264.

Villeneuve, N. (2002). *Epilepsia y convulsiones*. Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, París.

Wess, J. (1996). Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Rev Neurobiol*, Vol. 10, Num. 1, 69– 99.

Winks, J.S., Hughes, S., Filippov, A.K., Tatulian, L., Abogadie, F.C., Brown, D.A., Marsh, S.J. (2005). Relationship between Membrane Phosphatidylinositol-4,5 Bisphosphate and Receptor-Mediated Inhibition of Native Neuronal M Channels. *The Journal of Neuroscience*, Vol. 25, Num.13, 3400–3413.

Womble, M. D., y Moises, H. C. (1994). Metabotropic glutamate receptor agonist ACPD inhibits some, but not all, muscarinic-sensitive K⁺ conductances in basolateral amygdaloid neurons. *Synapse*, Vol. 17, 69- 75.

Wykes, R.C y Lignani. G. (2017). Gene therapy and editing: Novel potential treatments for neuronal channelopathies. *Neuropharmacology*.

Yang, W.P., Levesque, P.C., Little, W.A., Conder, M.L., Ramakrishnan, P., Neubauer, M.G. (1998). Functional expression of two KvLQT1-related potassium channels responsible for an inherited idiopathic epilepsy. *J Biol Chem*, Vol. 273: 19419-23.

Zimprich, F., Ronen, G.M., Stogmann, W., Baumgartner, C., Stogmann, E., Rett, B., Pappas, C., Leppert, M., Singh, N., Anderson, V.E. (2006). Andreas Rett and benign familial neonatal convulsions revisited. *Neurology*, Vol. 67, 864-866.