



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

**SITIO DE UNIÓN DE MIBEFRADIL EN EL CANAL DE
CALCIO Cav3.1**

Tesis para obtener el título de:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A

LUISA MARÍA PORTILLO PÉREZ

DIRECTOR:

JUAN CARLOS GÓMORA MARTINEZ



Febrero de 2025

Tabla de Contenido

RESUMEN	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 EXCITABILIDAD CELULAR Y CANALES IÓNICOS	5
1.2 CLASIFICACIÓN DE CANALES Ca_v	6
1.3 ESTRUCTURA MOLECULAR DE LOS CANALES Ca_v	9
1.4 CANALES DE CALCIO TIPO T	11
1.5 FARMACOLOGÍA DE LOS CANALES TIPO T	12
2. ANTECEDENTES	15
2.1 EFECTO ANTAGONISTA DEL TTA-A2 Y SU SITIO DE UNIÓN EN EL CANAL $Ca_v3.1$	15
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS	17
3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
3.2 OBJETIVO GENERAL	17
3.3 OBJETIVOS PARTICULARES	17
4. METODOLOGÍA	18
4.1. ACOPLAMIENTO MOLECULAR (<i>DOCKING</i>)	18
4.2. CONSTRUCCIÓN MOLECULAR DE CANALES $Ca_v3.1$ MUTANTES	19
4.3. CULTIVO DE CÉLULAS HEK-293	23
4.4. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HEK-293 CON LOS CANALES $Ca_v3.1$	23
4.5. EXPERIMENTOS ELECTROFISIOLÓGICOS	24
4.5.1. PROTOCOLOS DE VOLTAJE	25
4.5.2. SOLUCIONES DE REGISTRO	27
4.5.3. ELECTRODOS DE REGISTRO	27
4.6. ANÁLISIS DE LOS DATOS	28
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
5.1. <i>DOCKING</i> : APROXIMACIONES INICIALES	29
5.2 CONSTRUCCIÓN DE LOS CANALES $Ca_v3.1$ MUTANTES	29
5.2.1. CONSTRUCCIÓN DE CANALES MUTANTES DEL DIS6	31

5.2.2 CONSTRUCCIÓN DE CANALES MUTANTES DEL DIIS6	31
5.3. EFECTO ANTAGONISTA DEL MIBEFRADIL EN LOS CANALES $Ca_v3.1$	34
5.3.1 EFECTO ANTAGONISTA DEL MIBEFRADIL EN LAS MUTANTES DEL DOMINIO IV DE LOS CANALES $Ca_v3.1$	37
5.4. PROPIEDADES BIOFÍSICAS DE LOS CANALES MUTANTES	40
5.4.1. DEPENDENCIA AL VOLTAJE DE LA ACTIVACIÓN	40
5.4.2. INACTIVACIÓN EN EL ESTADIO ESTACIONARIO	43
5.4.3. CINÉTICA DE LAS CORRIENTES	44
5.5. DETERMINACIÓN DEL MODO DE UNIÓN DEL MIBEFRADIL EN EL CANAL $Ca_v3.1$	50
6. CONCLUSIONES	54
<hr/>	
7. REFERENCIAS	55

RESUMEN

Los canales de calcio tipo T son proteínas transmembranales que participan en procesos celulares como la excitabilidad celular, secreción hormonal, contracción muscular y fertilización. Se encuentran expresados en múltiples órganos y tejidos, incluyendo corazón, riñón, músculo liso y en el sistema nervioso central y periférico. Particularmente, en las regiones del tálamo y corteza cerebral juegan un papel importante en la regulación de la actividad neural. La rápida activación de estos canales a voltajes cercanos al potencial de membrana de las neuronas es esencial para la generación de potenciales de acción de bajo umbral, que a su vez conducen a la generación de disparos en ráfaga y un comportamiento oscilatorio. Alteraciones en estas oscilaciones se han implicado en trastornos neurológicos como la epilepsia de tipo ausencia, el temblor asociado al Parkinson y dolor neurogénico. Por ello, se han convertido en blancos para el tratamiento de este tipo de patologías.

A la fecha se conocen pocos bloqueadores selectivos de los canales tipo T, también llamados Cav3. El mibefradil es uno de los pocos antagonistas con alta selectividad para estos canales, no obstante, debido a efectos adversos fatales su uso en la clínica fue prohibido, aunque se sigue usando para estudios de investigación básica. Las bases moleculares del acoplamiento molecular entre el mibefradil y los canales tipo T, por ejemplo, permanece como una incógnita por dilucidar.

En objetivo del presente trabajo de tesis fue identificar los aminoácidos que forman el sitio de unión del mibefradil en el canal de calcio tipo T Cav3.1. Se utilizaron herramientas computacionales (*docking*) y experimentales: mutagénesis dirigida para la generación de canales mutantes y *patch-clamp* para las mediciones de corrientes de calcio. Los resultados permitieron identificar a la Valina 1809 como un aminoácido crucial en la interacción del mibefradil con el canal Cav3.1. Análisis adicionales sugieren que el modo de unión más probable del mibefradil con el canal, lo ubica en una posición cercana al filtro de selectividad y la compuerta intracelular. El entendimiento de la interacción fármaco-proteína permitirá la búsqueda de similitudes con sitios de unión de otros bloqueadores de canales de calcio tipo T, que a su vez permita establecer estructuras o secuencias blanco para el diseño de antagonistas más potentes y selectivos de este tipo de canales iónicos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Excitabilidad celular y canales iónicos

La actividad eléctrica de las neuronas y otras células excitables depende de varios tipos de canales iónicos; desde las bacterias hasta humanos, la señalización eléctrica y comunicación celular depende de la respuesta rápida y altamente sensible de estos canales. Los canales iónicos son proteínas transmembranales formadoras de poros que permiten el flujo de iones a través de las membranas plasmáticas impulsados por su gradiente químico (1, 2). Una de las propiedades más importantes es su selectividad iónica, es decir, permiten el paso de algunos iones, pero no de otros, de modo que solo los iones de tamaño y carga adecuados puedan atravesar el poro del canal. Los canales iónicos pueden activarse en respuesta a un estímulo, por ejemplo, estrés mecánico (canales activados mecánicamente), la unión de un ligando, tal como las hormonas o neurotransmisores (canales activados por ligando), o los canales activados por cambios en el potencial de membrana (canales activados por voltaje, CIAV). Estos últimos son específicos a ciertos tipos de iones, por ejemplo, pueden ser permeables a iones sodio (canales Na_v), potasio (canales K_v), y calcio (canales Ca_v) (3, 4). Por lo tanto, la apertura de cada tipo de canal iónico permite el paso de iones con base en su gradiente químico y la selectividad por cada uno de ellos.

El estudio de los canales iónicos se inició con los trabajos de Hodgking y Huxley publicados en 1952, en ellos, se reporta el análisis mediante fijación de voltaje de las corrientes iónicas que subyacen la excitabilidad celular, es decir, la generación y propagación de potenciales de acción, en el axón gigante de calamar. Con base en dichos trabajos, Hodgking y Huxley propusieron que el flujo de la corriente iónica a través de la membrana del axón es debido a dos componentes: el flujo de iones de sodio (Na^+) y de potasio (K^+); cada uno independiente del otro y en direcciones opuestas, el Na^+ es transportado al interior de la célula y el K^+ hacia el exterior. Lo anterior llevó a la descripción de las bases iónicas de la generación de impulsos eléctricos en el axón gigante de calamar, y a partir de estos experimentos se inició el descubrimiento e importancia de los canales iónicos activados por voltaje (CIAV) (5, 6).

Los CIAV juegan un papel central en la transmisión de señales eléctricas a lo largo de la membrana de neuronas y otras células excitables, median la comunicación celular en la sinapsis, contracción muscular, participan en múltiples procesos regulatorios involucrados en la transducción de señales y proliferación celular. Los CIAV que conducen K^+ (canales K_v), Na^+ (canales Na_v) y Ca^{2+} (canales Ca_v) tienen un papel predominantemente electrogénico; sin embargo, los iones Ca^{2+} no solo contribuyen al potencial de membrana, sino que también fungen como entidades de señalización celular. El Ca^{2+} que ingresa a la célula también sirve como segundo mensajero en la señalización eléctrica, iniciando muchos eventos celulares diferentes, modulando una serie de respuestas neuronales esenciales, como la activación de enzimas dependientes de calcio, la expresión genética, la liberación de neurotransmisores desde sitios presinápticos, y la regulación de la excitabilidad neuronal (7). En condiciones normales de reposo, las concentraciones de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) se encuentran en el rango de 100 nM debido a las moléculas de amortiguación de calcio y al secuestro en las reservas de calcio intracelular (7, 8, 9). No obstante, varios estímulos celulares como la despolarización de la membrana, moléculas de señalización extracelular, o mensajeros intracelulares pueden promover incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ desde 100 nM hasta 1 μ M o más (9).

La mayoría de las células expresan diferentes subtipos de Ca_v , y presentan diferentes propiedades fisiológicas y farmacológicas. En células endocrinas, inician la liberación de hormonas; en neuronas, son importantes en la regulación de la expresión génica, la integración de la entrada sináptica y el inicio de la liberación de neurotransmisores durante la sinapsis (7, 10); en células cardíacas, de músculo liso y músculo esquelético, la activación de los canales son responsables de iniciar las contracciones musculares además de regular su duración e intensidad en respuesta a trenes de impulsos nerviosos de alta frecuencia (11). La diversidad de propiedades y funciones de los canales permite distinguir y clasificar a nivel molecular a la familia de los canales Ca_v .

1.2. Clasificación de canales Ca_v

Los canales del calcio activados por voltaje fueron identificados por Fatt y Katz en 1953, en músculo de crustáceos, en un experimento en que la solución de baño no contenía Na^+ , se observó que el músculo era capaz de generar potenciales de acción (12). Más tarde,

en la década de los 80's Fischman y Spector reportaron la existencia de dos grupos de canales de calcio en mamíferos; los canales de alto umbral de activación o HVA (*High-Voltage Activation*), que requieren cambios de potencial mayores a 40 - 50 mV con respecto al potencial de membrana (V_m ; regularmente con un valor de entre -70 o -60 mV). Dentro de estos se encuentran los canales tipo L y los no L (12, 13) (**Fig. 1**). El segundo grupo son los canales de bajo umbral de activación o LVA (*Low-Voltage Activation*), que se activan en respuesta a pequeñas despolarizaciones de membrana (20 - 30 mV) con respecto al V_m ; presentan una inactivación más rápida (15 a 30 ms) respecto a los canales HVA (2000 ms), pero se desactivan aproximadamente de 10 a 100 veces más lentamente que los canales HVA (13, 14). Además, la conductancia de un solo canal LVA es muy baja, oscilando entre 5 y 9 pico Siemens (pS); por lo cual también se les conoce como canales tipo T: T de transitorio (*transient*; inactivación rápida) y conductancia diminuta (*tiny*), mientras que la de los HVA es de alrededor de 24 pS (14, 15).

Los canales de calcio son clasificados con base en la similitud de aminoácidos que conforman la subunidad α_1 , lo que permite distinguir tres subfamilias: Cav1, Cav2 y Cav3, las cuales comprenden 10 miembros en total (**Fig. 1**). La subfamilia Cav1 está conformada por cuatro canales tipo L (Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3 y Cav1.4) que se encuentran principalmente en músculo esquelético, neuronas, músculo cardíaco y tejido endocrino; se caracterizan por poseer conductancias unitarias grandes de ~20-24 pS (15); corrientes de larga duración y alta sensibilidad a las dihidropiridinas (DHPs) (16, 17). Estudios en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG por sus siglas en inglés) de pollo, permitieron descubrir canales con una conductancia intermedia entre tipo L y tipo T pero con propiedades electrofisiológicas parecidas a ambos: se activan a voltajes de membrana intermedios y presentan voltajes de inactivación más negativos que los de tipo L, a este grupo se le denominó canales tipo N (*neither*, ni L ni T), que no son sensibles a las DHPs, pero sí a la toxina llamada ω -conotoxina GVIA y MVIIA de *Conus geographus* y *Conus magus*, respectivamente. Este tipo de canal fue el primer miembro descrito de la subfamilia Cav2, clasificado como Cav2.2; a la cual se sumaron dos miembros más, Cav2.1, codificado por la subunidad α_1A y el cual genera corrientes tipo P y tipo Q (como resultado del procesamiento alternativo del mRNA). Ambos canales son bloqueados por diferentes concentraciones de ω -agatoxina IVA, péptido aislado del veneno de la araña conocida

como *funnel web* (telaraña de embudo). Los canales que expresan corriente tipo P presentan una cinética de inactivación más rápida y mayor sensibilidad a esta toxina comparado con las corrientes tipo Q. Tanto Cav2.1 como Cav2.2 se expresan predominantemente en dendritas neuronales y terminales sinápticas mientras que el último miembro de esta familia, el Cav2.3 que codifica para corriente de calcio tipo R, se expresa en el cuerpo neuronal y dendritas. Este último se caracteriza por su insensibilidad a bloqueadores típicos de los canales tipos L y N, pero es fuertemente inhibido por componentes del veneno de la araña *Agelenopsis aperta*, muestra inactivación más rápida que las corrientes tipo P/Q y N, se activan alrededor de -40 mV y alcanzan una amplitud máxima a 0 mV, y son igualmente sensibles al bloqueo por iones Cd²⁺ y Ni²⁺ (18, 19, 20, 21, 22, 23).

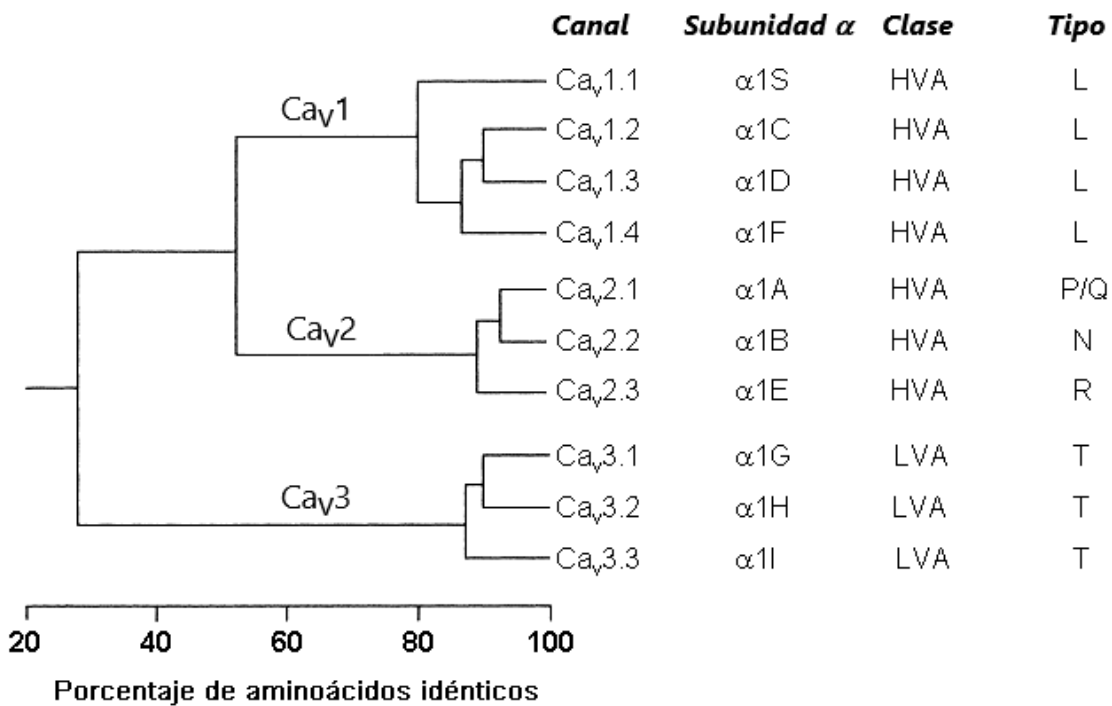


Figura 1. Árbol filogenético de las subunidades α 1 de los canales Cav. Identidad en la secuencia de aminoácidos de las subunidades α 1 de los canales Cav. Para los alineamientos se consideró únicamente los residuos de las regiones que atraviesan la membrana y las asas que forman parte del poro de conducción. Estas secuencias se alinearon empleando el software DNAsis con el algoritmo CLUSTAL. El alineamiento múltiple de secuencias define tres subfamilias indicadas, así como el nombre de la subunidad principal, la clase y el tipo de canal. Adaptada de [21].

Los canales LVA son representados únicamente por la subfamilia Cav3 o canales tipo T y contiene tres miembros: Cav3.1, Cav3.2 y Cav3.3. Se expresan ampliamente en las neuronas del SNC y el SNP, y en tejidos como la glándula suprarrenal (24). Los Cav3.1 y Cav3.2 se activan e inactivan más rápido, en comparación con Cav3.3, mientras que estos últimos presentan una cinética de desactivación más rápida. Los tres canales son bloqueados por mibefradil más potentemente que los canales HVA, mientras que el Ni²⁺ es un bloqueador altamente selectivo de los canales Cav3.2 (25, 26).

1.3 Estructura molecular de los canales Cav

Los canales Cav son complejos multiproteicos formados por las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2\delta$, β , y γ (**Fig. 2**); de las cuales la subunidad $\alpha 1$ es la principal por ser la más grande y la que forma el poro de conducción iónica, así como por contener las estructuras relacionadas con la activación dependiente de voltaje. Por su parte, las otras subunidades se conocen como proteínas accesorias de los canales HVA, ya que en los LVA se ha demostrado que no existe una interacción física con estas subunidades (27, 28, 29).

Las primeras subunidades $\alpha 1$ fue aisladas de músculo esquelético de conejo en 1973. Las subunidades $\alpha 1$ formadoras del poro de todos los Cav presentan topologías casi idénticas, con aproximadamente 2000 aminoácidos y un peso molecular de 190 a 250 kDa (30). Consisten en cuatro Dominios homólogos (I al IV), cada uno de los cuales se arregla en seis segmentos transmembranales (S1 a S6). Los segmentos S5 y S6 de cada dominio forman el recubrimiento del poro del canal (PD), dichos segmentos son unidos por un asa que se invagina parcialmente en la membrana dando lugar a la parte más estrecha del poro del canal y que se conoce como el filtro de selectividad, el cual está conformado por residuos de aminoácidos con carga negativa altamente conservados. En el caso de los canales HVA son 4 ácidos glutámicos (EEEE), mientras que, en los LVA, el ácido glutámico es remplazado por ácido aspártico en los Dominios III y IV (EEDD) (31, 32, 33). La función de estos cuatro aminoácidos es la de proveer la selectividad de los canales Cav por cationes de calcio, bario y estroncio (28, 34). Por su parte, los segmentos S1-S4 de cada Dominio constituyen el dominio de detección de voltaje (VSD) (**Fig. 2**);, donde el segmento S4 de cada dominio presenta de cuatro a siete aminoácidos cargados

positivamente, generalmente argininas o lisinas, que se repiten cada tres posiciones en la hélice del S4, y que en su conjunto actúan como 'sensor de voltaje' del canal (35, 36).

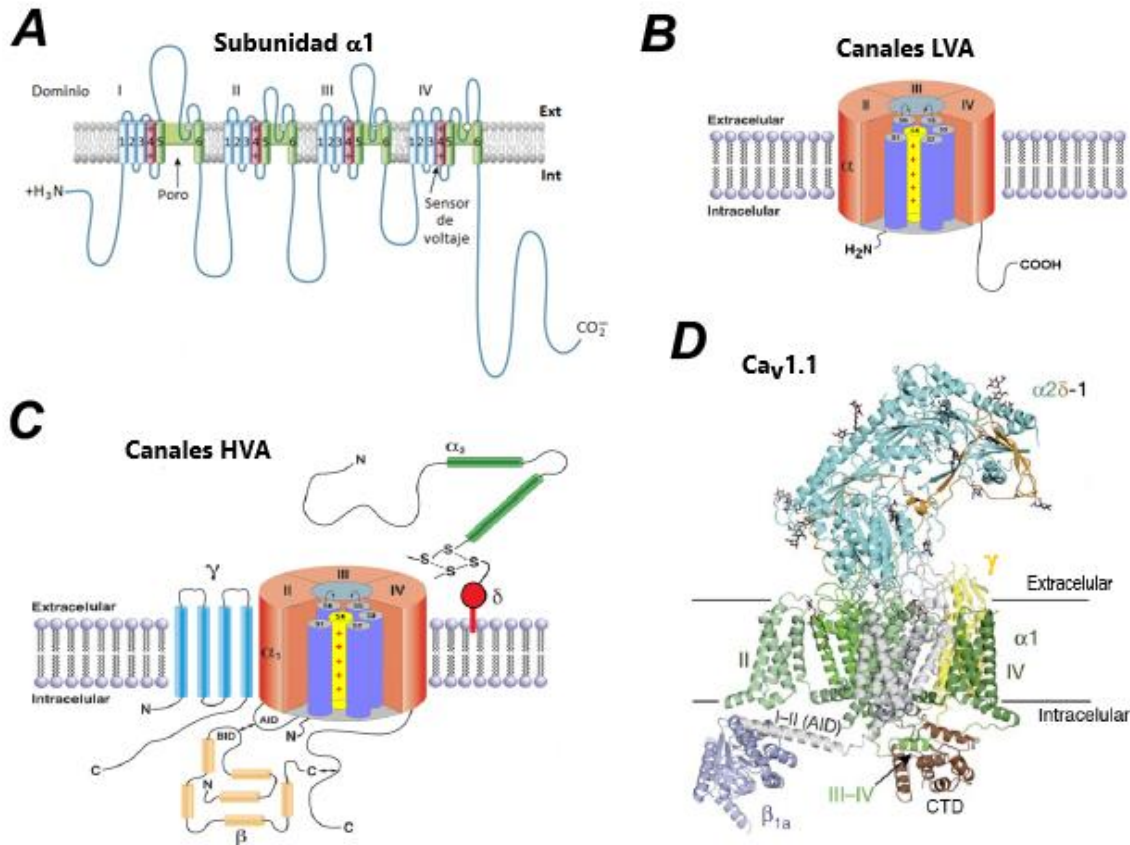


Figura 2. Representación esquemática y estructura molecular de los canales Ca_v . **A)** Conceptualización esquemática de la estructura primaria de la subunidad $\alpha 1$, la única que es común a los canales LVA y HVA. Esta consiste en 4 dominios homólogos (I al IV), cada uno con 6 segmentos transmembranales (S1 a S6), y un asa del poro (P) entre el S5 y S6. El segmento S4 posee varios aminoácidos con carga positiva que le confieren la característica de sensor de voltaje. **B** y **C)** Topología propuesta para el patrón de ensamblaje de un canal LVA y un HVA, respectivamente. Las evidencias experimentales sugieren que los canales LVA consisten únicamente de la subunidad principal $\alpha 1$. Por su lado, los canales HVA incluyen además diferentes subunidades accesorias: $\alpha 2\delta$, β , y γ . El poro central se forma por el plegamiento de los cuatro dominios que conforman la subunidad $\alpha 1$. El sensor de voltaje (S4) se muestra en amarillo. Las subunidades $\alpha 1$ y β interactúan en un sitio denominado AID en el asa que une los dominios I y II de la subunidad $\alpha 1$ (Modificado de 40). **D)** Estructura molecular del canal de calcio de músculo esquelético de conejo ($Ca_v 1.1$) resuelta por Criomicroscopía electrónica a una resolución de 4,2 Å (Cryo-EM; tomado de 41). El complejo multiproteico $Ca_v 1.1$ consta de la subunidad formadora del poro $\alpha 1$, y las subunidades auxiliares $\alpha 2\delta$, (azul cielo), β (morado) y γ (amarillo). El dominio de interacción α (AID) se presenta en gris, así como el dominio carboxilo terminal (CTD) en marrón (tomado de 41).

En la subfamilia de los canales Cav3, la subunidad $\alpha 1$ es suficiente para la función autónoma, determinando las principales propiedades biofísicas y farmacológicas de cada canal; mientras que para las familias Cav1 y Cav2 existen subunidades auxiliares o accesorias, $\alpha 2\delta$, β , y γ , que desempeñan funciones importantes en el plegamiento, tráfico a la membrana, y modulación de propiedades biofísicas y farmacológicas del canal. Existen 4 subunidades β y 4 $\alpha 2\delta$, y cada canal puede ensamblarse con una de esas subunidades accesorias. Las subunidades $\alpha 1$ interactúan con las subunidades $\alpha 2\delta$ a través de los segmentos extracelulares, mientras que la interacción con las subunidades β es por el lado citosólico. Una subunidad más puede sumarse al complejo, la denominada subunidad γ , la cual comparte el mismo patrón de plegamiento con las claudinas (37, 38). Cabe mencionar nuevamente que las subunidades $\alpha 1$ de los canales Cav3 generan corrientes tipo T por sí solas sin la necesidad de interactuar con las subunidades accesorias de los canales HVA (39, 40, 41).

1.4 Canales de calcio tipo T

Los canales de calcio tipo T, LVA o Cav3, son expresados a lo largo de todo el cuerpo, incluyendo el tejido nervioso, corazón, riñones, músculo liso, espermatozoides y varios órganos endocrinos. Estos canales están implicados en una amplia variedad de procesos fisiológicos, que incluyen la actividad neuronal, secreción hormonal, contracción del músculo liso, fusión de mioblastos, y fertilización (25, 42). El bajo umbral de activación de los canales Cav3 es cercano al potencial de reposo de la mayoría de las células excitables, lo cual aunado a su cinética rápida, propicia que estos canales de Ca^{2+} sean moduladores clave de la excitabilidad celular y marcapasos (25). Además, también se le ha implicado en múltiples procesos fisiológicos tales como la nocicepción, la automaticidad eléctrica, la constricción y dilatación de los vasos sanguíneos, la contracción de los vasos linfáticos, la contracción del músculo liso, la fusión de mioblastos, la liberación de neurotransmisores, la fertilización, el crecimiento celular, la diferenciación y la proliferación (43, 44, 45).

Los canales tipo T representan un papel importante en la regulación de patrones de activación neuronal (mesetas de calcio de bajo umbral y activación en ráfaga de potenciales de acción), así como en las pequeñas despolarizaciones de membrana que desencadenan la apertura de estos canales, lo que despolariza aún más la membrana

iniciando ráfagas de potenciales de acción (46, 47). La activación rápida de los canales tipo T a bajos voltajes es esencial para la generación de espigas (potenciales de acción) de bajo umbral (LTS), que provocan disparos en ráfaga y comportamiento oscilatorio, importante en la activación sensorial, el sueño y la excitación (26). Los cambios patológicos en estas oscilaciones, llamadas arritmias talamocorticales, las cuales se han implicado en trastornos neurológicos, entre ellos, epilepsia de tipo ausente, el temblor asociado al Parkinson, trastornos neuropsiquiátricos y dolor neurogénico (42, 47, 48, 49). Se sabe que varios fármacos antiepilépticos de uso clínico suprimen las convulsiones por medio de la inhibición de los canales de calcio tipo T, esto debido a su participación en la generación de la actividad talamocortical oscilatoria hiper sincrónica observada en las crisis de ausencia (50, 51, 52).

La relevancia de los canales de calcio tipo T en la fisiología del humano se evidencia por la existencia de varias canalopatías, las cuales son desordenes causados o exacerbados por mutaciones en los genes que codifican para estos canales. Las manifestaciones clínicas de tales desordenes son debidas principalmente a la disfunción de las propiedades biofísicas y del tráfico de los canales a la membrana plasmática, lo que deriva en una ganancia o pérdida de función del canal. Dentro de las canalopatías más conocidas se encuentran la epilepsia idiopática generalizada, desordenes de autismo, dolor crónico, y aldosteronismo primario, todas estas asociadas a mutaciones en el gen que codifica para el canal Cav3.2 (*CACNA1H*); mientras que en el del canal Cav3.1 (*CACNA1G*) se han reportado mutaciones presentes en ataxia cerebelar principalmente, y más recientemente, en el del canal Cav3.3 (*CACNA1I*) se han observado mutaciones en pacientes con esquizofrenia (50, 51, 52).

1.5 Farmacología de los canales tipo T

La corriente de los canales de calcio tipo T es susceptible al bloqueo por antagonistas orgánicos e inorgánicos, muchos de los cuales tienen cierta selectividad sobre otros canales de calcio (tipo L, por ejemplo). En general no existen antagonistas o toxinas altamente específicas para la corriente tipo T. Cationes divalentes y trivalentes, como La^{3+} , Ni^{+2} , Cd^{+2} y Zn^{+2} son bloqueadores efectivos de las corrientes tipo T (53, 54, 55). Existen varias toxinas o componentes de veneno capaces de bloquear corrientes de canales de

calcio HVA, sin embargo, son pocas las moléculas de este tipo que pueden bloquear de forma selectiva y potente a las corrientes de los canales tipo T. La kurtoxina, una toxina de escorpión es capaz de bloquear a concentraciones micromolares los canales tipo T, sin embargo, bloquea las corrientes de sodio con una potencia similar (56).

El mibefradil se considera que fue el primer fármaco selectivo y potente en bloquear la corriente de los canales tipo T, es un derivado de tetralina (tetralol) sustituido con bencimidazolilo y está compuesto por un enantiómero único con un peso molecular de 568.56 Da y valores de pKa de 4.8 (para el grupo bencimidazolilo) y 5.5 (para el grupo amino terciario). Estas propiedades de carga diferente sugieren que los dos compuestos pueden interactuar con el canal de calcio de manera diferente dentro de la membrana celular (57, 58). Fue introducido al mercado en 1997 para su uso en hipertensión arterial y angina de pecho, sin embargo, fue abruptamente retirado debido a interacciones farmacocinéticas adversas con sustratos del CYP3A4 coadministrados a los pacientes, como betabloqueantes, digoxina, verapamilo y diltiazem. Se encontró que el mibefradil inhibe varias enzimas del citocromo P450, implicadas en el metabolismo de los fármacos, particularmente es un inhibidor de CYP3A4, y de sistemas como la glucoproteína P, transportadora de fármacos, lo que aumenta la gravedad de las interacciones farmacológicas, razón por la cual el mibefradil se retiró de la clínica (59, 60, 61, 62, 63).

No obstante, la prohibición para su uso en la clínica, el mibefradil se utiliza en investigación básica para conocer los mecanismos de inhibición de diferentes tipos de canales iónicos. El mibefradil bloquea los tres canales de calcio tipo T con similar potencia a concentraciones sub micromolares, esto es, 10 a 30 veces menos que las concentraciones requeridas para bloquear los canales HVA. Experimentos electrofisiológicos en varios canales nativos tipo T muestran un rango de valores de IC₅₀ de 0.1 a 4 µM. Por ejemplo, en músculo vascular liso, el mibefradil muestra una mayor potencia de bloqueo, con una IC₅₀ de 0.1 a 0.2 µM, en contraste, corrientes tipo T registradas en células espermatozógenas de ratón, son menos sensibles al bloqueo por Mibefradil con una IC₅₀ de 4.7 µM (64).

En condiciones de registro con 2 mM de Ca⁺² como acarreador de carga, se obtiene una IC₅₀ para Cav3.1 de 0.27 ± 0.03 µM, para Cav3.2 de 0.14 ± 0.2 µM, mientras que para

Cav3.3 es de $1.5 \pm 0.1 \mu\text{M}$, en contraste, la IC_{50} para los canales tipo L, de $12.9 \pm 1.3 \mu\text{M}$ (65).

Una característica importante del mibefradil es que al igual que otros bloqueadores de canales de calcio como las DHPs, es un bloqueador dependiente de estado, es decir, muestra mayor afinidad, por el estado inactivado del canal. Lo anterior representa una ventaja como posible herramienta terapéutica en comparación con los inhibidores de Cav cuyo mecanismo de acción es independientes del estado del canal (66, 67).

2. ANTECEDENTES

2.1 Efecto antagonista del TTA-A2 y su sitio de unión en el canal Cav3.1

De más reciente creación que el mibefradil, el TTA-A2 es un antagonista altamente selectivo y potente de los canales de calcio tipo T. Su efecto inhibitorio se ha estudiado en diversos tipos celulares y se ha reportado que en Cav3.1 presenta una IC₅₀ de alrededor de 1 μ M (68), por lo que representa un blanco de interés por parte de nuestro grupo de investigación. El Físico Eduardo Chávez Colorado realizó un proyecto que se centró en localizar el sitio de unión del TTA-A2 en el canal Cav3.1 (69). En su trabajo de tesis Eduardo Chávez realizó ensayos de *docking* con el TTA-A2, usando para ello un modelo tridimensional de la subunidad α 1 de los canales tipo T que Eduardo generó por homología basado en el canal Nav aislado de *Arcobacter butzleri* (PDB 4MS2 y 3RVY) (70). El modelo tridimensional contiene los 24 segmentos transmembranales de la subunidad α 1, únicamente se excluyeron las asas intracelulares que unen cada dominio, así como el extremo amino y carboxilo (**Fig. 3**). En adelante a este modelo se denominará Cav3.1-203IFC.

Las simulaciones de *docking* realizadas en el modelo Cav3.1-203IFC condujeron a un residuo de Glutamina (Q1805) ubicado en el S6 del Dominio IV, el cual fue substituido por varios aminoácidos y las mutantes resultantes del canal Cav3.1, así como el canal silvestre (WT) se caracterizaron electrofisiológicamente para analizar el bloqueo del TTA-A2. Los resultados mostraron una disminución significativa en la cantidad de corriente bloqueada por el TTA-A2 en las mutantes con respecto al canal Cav3.1-WT (**Fig. 4A**). Lo anterior permitió conocer la importancia de este residuo en la unión del TTA-A2 en la proteína del canal Cav3.1, el cual se ubica en la cavidad central y considerando como una posible ruta de acceso alguna de las cuatro fenestraciones del modelo (**Fig. 3**), mismas que comunican la cavidad central con el interior de la membrana plasmática, como se ha demostrado en los canales Nav (71). De suma relevancia para el presente trabajo resultó ser los resultados adicionales de Eduardo mostrando que el sitio de unión encontrado para el TTA-A2 no parece ser el mismo que el del mibefradil, ya que las mutantes de la Q1805 no modificaron el bloqueo del mibefradil en comparación con el observado en el canal Cav3.1-WT (**Fig. 4B**), con la excepción de la mutante por Arginina (Q1805R) en la que se redujo el

porcentaje de bloqueo del mibefradil. Sin embargo, debido a que las mutaciones por Alanina (Q1805A) y Prolina (Q1805P) no alteran dicho bloqueo, no se puede concluir que la Q1805 forme parte del sitio de unión del mibefradil, pues la reducción en la potencia del bloqueo por mibefradil en la mutante Q1805R se puede deber a los cambios introducidos por la extensión de la cadena lateral (la más larga de los 20 aminoácidos) y su carga neta positiva a la estructura de la hélice alfa del IVS6 (69).

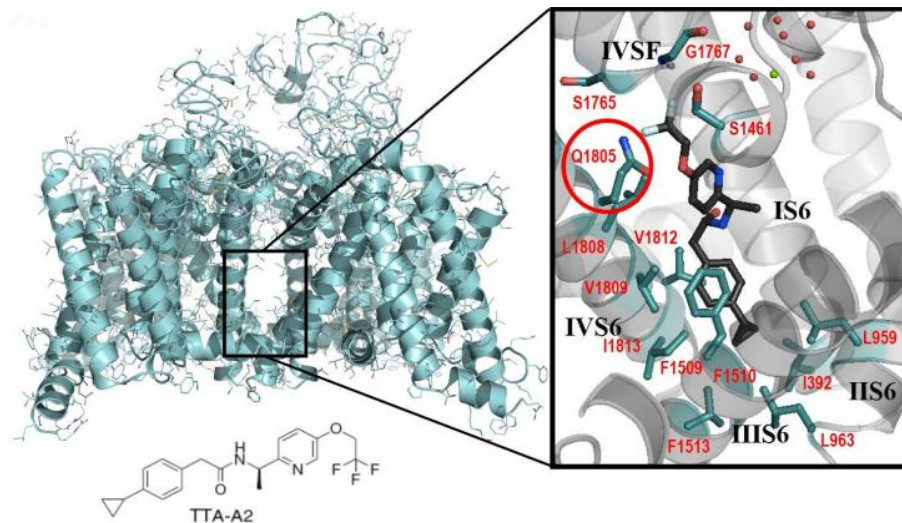


Figura 3. Modelo tridimensional del canal $Ca_v3.1$ generado por homología (Cav3.1-2031FC). Se muestran los 6 segmentos transmembranales de cada uno de los 4 Dominios de la subunidad $\alpha1G$, así como las asas extracelulares. En el recuadro se muestra un acercamiento de la cavidad central donde se localizó el sitio de unión del TTA-A2. Resaltado con un círculo rojo el aminoácido Glutamina de la posición 1805 (Q1805), que es crucial para el efecto bloqueador del TTA-A2 sobre la corriente de calcio, y otros aminoácidos que podrían estar interactuando en el acoplamiento receptor-ligando (69).

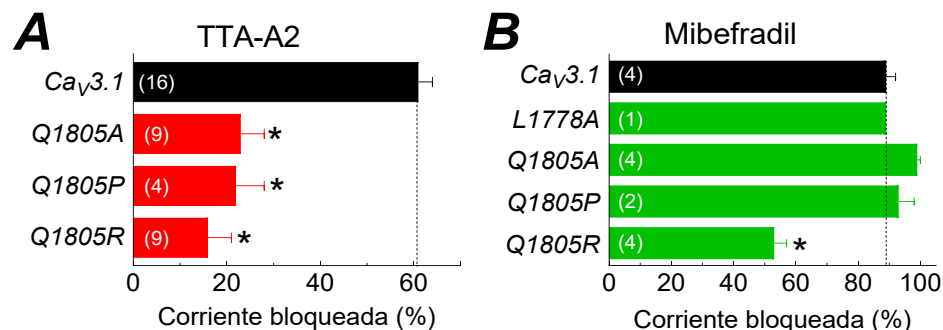


Figura 4. Efecto del TTA-A2 y del mibefradil en canales $Ca_v3.1$. Porcentaje de bloqueo de la corriente de calcio en el canal $Ca_v3.1$ silvestre y las mutantes indicadas, en presencia de 3 μM de TTA-A2 (A) y 1 μM de mibefradil (B). Los asteriscos denotan diferencias significativas ($p < 0.01$) entre las medias de las mutantes en cuestión en comparación con el canal silvestre ($Ca_v3.1$). Modificada de 69.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

3.1 Planteamiento del problema

Los canales de calcio tipo T están implicados en una amplia variedad de procesos fisiológicos, entre ellas distintas enfermedades y síndromes, en las que se ha referido la inhibición de los canales de calcio tipo T (51) como parte del tratamiento terapéutico. Por ello, se han convertido en blancos para el tratamiento de desórdenes del sueño, tratamientos anti-epilépticos, y más recientemente para padecimientos como el dolor neuropático y esquizofrenia. No obstante, a la fecha se conocen pocos bloqueadores selectivos de estos canales, el mibefradil es uno de los pocos antagonistas con alta selectividad para los canales tipo T. Es un bloqueador dependiente de estado, fue lanzado al mercado en 1997 para el tratamiento de la hipertensión, sin embargo, debido a efectos adversos fatales debido a interacciones farmacocinéticas, el mibefradil fue retirado del mercado y solo se utiliza en investigación básica. Es por ello que la localización del sitio de unión del mibefradil es importante para conocer las similitudes en los sitios de unión de otros bloqueadores de canales de calcio tipo T, que permita establecer estructuras o secuencias blanco para el diseño de mejores antagonistas de este tipo de canales iónicos.

3.2 Objetivo general

Identificar los aminoácidos que forman el sitio de unión del mibefradil en el canal de calcio activado por voltaje Cav3.1.

3.3 Objetivos particulares

- Realizar simulaciones de acoplamiento molecular (*docking*) entre el mibefradil y el canal Cav3.1.
- Construcción de canales mutantes basadas en las simulaciones de *docking*.
- Caracterizar las propiedades biofísicas de las mutantes de Cav3.1 y compararlas con el canal Cav3.1 silvestre.
- Cuantificar y analizar el efecto antagonista del mibefradil en el canal Cav3.1-WT y las mutantes de este.

4. METODOLOGÍA

De manera general la estrategia experimental consistió en construir mutantes del canal Cav3.1 mediante mutagénesis dirigida al sitio, sustituyendo aminoácidos candidatos obtenidos mediante las simulaciones de acoplamiento molecular (*docking*). Posteriormente, los canales mutantes fueron estudiados con la técnica de *patch-clamp* para investigar si el efecto bloqueador del mibefradil se modifica debido a la mutación y finalmente caracterizar las propiedades biofísicas de las mutantes que pudieran ser relevantes para el sitio de unión del mibefradil en el canal Cav3.1.

Las mutaciones consistieron en sustituir los aminoácidos candidatos por Alanina (Ala o A) y Arginina (Arg o R). La sustitución por Ala equivale a truncar la cadena lateral de cualquier aminoácido, eliminando las interacciones propias de la cadena lateral de los aminoácidos sin alterar la conformación de la estructura de la proteína. Por su parte, la sustitución por Arginina (R) introduce cambios drásticos en la estructura de la proteína, pues agrega una carga neta positiva y cambios fisicoquímicos importantes, dado la cadena lateral tan larga que este residuo posee. Estas mutaciones proporcionaran información sobre la posible interacción molecular del mibefradil con los aminoácidos candidatos, lo que permitirá determinar el sustrato molecular del sitio de unión del mibefradil en el canal Cav3.1.

4.1. Acoplamiento molecular (*docking*)

Las simulaciones de docking, se realizaron en el programa AutoDock Vina 1.1.2. (72), mediante la interfaz gráfica UCSF Chimera (73) se visualizó tanto el ligando como el receptor. Las rotaciones posibles de las cadenas laterales de los aminoácidos estudiados se generaron mediante el programa AutoDock tools, mientras que los cambios de aminoácidos, la asignación de cargas parciales y los átomos de hidrogeno no polares se llevó a cabo en el programa Chimera.

El modelo del compuesto del mibefradil se obtuvo de Drugbank (N° de acceso DB01388). La subunidad $\alpha 1$ del canal Cav3.1 fue generada *in silico*, mediante modelado por homología por el Físico Eduardo Chávez Colorado (69). Este modelo, el Cav3.1-203IFC, fue usado en los primeros experimentos del presente trabajo. Sin embargo, durante el transcurso del proyecto Zhao y colaboradores (74) obtuvieron por microscopia

crioelectrónica (Cryo-EM) la estructura completa del Cav3.1 humano. El archivo PDB generado de este trabajo (6KZ0) fue usado para realizar los experimentos de *docking* subsecuentes, de la misma manera se realizaron comparaciones con el modelo generado en el laboratorio de la subunidad $\alpha 1$ (Cav3.1-203IFC).

Para las simulaciones de acoplamiento molecular se utilizaron espacios de búsqueda denominados cajas de 30x30x30 Å, las cuales, fueron colocadas en varios espacios abarcando la totalidad de la proteína en cuestión. El tamaño de la caja fue ajustándose dado los espacios de búsqueda, reduciendo su tamaño al encontrar una pose candidata.

4.2. Construcción molecular de canales Cav3.1 mutantes

Se emplearon técnicas de biología molecular para generar los canales Cav3.1 mutantes. La estrategia utilizada principalmente fue la de extensión del empalme por PCR o SOE-PCR (75), la cual consta de tres reacciones de PCR y cuatro oligonucleótidos. Dos de los cuales son complementarios a la secuencia de DNA del canal Cav3.1-WT y que delimitan el tamaño del fragmento mutante que será remplazado en el canal silvestre (*primers* candado); así como dos oligonucleótidos complementarios uno del otro, en los cuales se introduce la mutación deseada (*primers* mutagénicos; **Tabla 1**). Se diseñaron *primers* degenerados empleando el programa DNAsis (Hitachi, Ltd., San Bruno, CA, EUA), con los cuales es posible introducir varias mutaciones de un mismo aminoácido en una sola reacción de PCR. Los oligonucleótidos fueron sintetizados en la Unidad de Biología Molecular (UBM) del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Para cada mutante se realizaron dos reacciones de PCR simultáneamente. La PCR 1 incluyó el *primer* candado sentido y el *primer* mutante antisentido, mientras que la PCR 2 incluyó el *primer* candado antisentido y el *primer* mutante sentido (**Fig. 5**). La cantidad de *primer* en cada reacción varió de 20 a 50 ng, y de 16 a 20 ng de ADN molde. En la reacción de PCR 1 y 2 se usó 1 unidad de la enzima Deep Vent DNA Polimerasa (New England BioLabs; Ipswich, MA, EUA) o 1 unidad de Pfu (Altaenzyme; Alberta, Canadá), 5 μ l de buffer 10x, 1 μ l de DNTp's (125 μ M; Invitrogen; Carlsbad CA, EUA) y H₂O para alcanzar un volumen final de 50 μ l en tubos Eppendorf de 0.2 ml.

Tabla 1. Nombre, secuencia y ubicación de los oligonucleótidos usados en las reacciones de PCR

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Ubicación
T949X	F: c att gcc ctc atg SS c ttc ggc aac tac gtg ctc R: gag cac gta gtt gcc gaa gSS cat gag ggc aat g	IIS6
F956X	F: c ggc aac tac gtg ctc SS c aat ttg ctg gtc gcc R: ggc gag cac caa att gSS gag cac gta gtt gcc g	IIS6
Y953X	F: c ctc atg acc ttc ggc aac SS c gtg ctc ttc aat ttg ctg R: cag caa att gaa gag cac gSS gtt gcc gaa ggt cat gag g	IIS6
T352X	F: c atc ttc cag gtc atc SS g ctg gag ggc tgg gtc R: gac cca gcc ctc cag cSS gat gac ctg gac gat g	IS6
346c	F: acc atg gac aac gtg gcc acc	IIS6
348c	R: a gat gcg ttc agc gct gtg gg	IIS6
344c	F: gag gac atc gcc tgt gac tcc	IS6
345c	R: cac cag gta ctt gag cag ctc c	IS6

Secuencias de los *primers* diseñados para la generación de fragmentos mutantes. Los nombres con una X al final corresponden a los *primers* degenerados, mientras que aquellos con una c al final son los *primers* candado. Las letras remarcadas en negro (**SS**) indican las bases degeneradas que introducen las mutaciones, donde el 50% de los *primers* presenta una Guanina (G) y el otro 50% de los *primers* contiene una citosina (C) en dichas posiciones. F, *primer* sentido; R, *primer* antisentido. IS6 y IIS6, segmento S6 del Dominio I y II del canal Ca_v3.1, respectivamente.

Las reacciones de PCR se realizaron en tres etapas en un termociclador Veriti (Applied Biosystems; Carlsbad, CA, EUA). El primer ciclo de desnaturalización se realizó a 94°C durante 60 s, seguido de 32 ciclos consecutivos de desnaturalización a 94°C durante 30 s, alineamiento a 61°C por 60 segundos e hibridación a 72°C por 60 s; finalmente una etapa de extensión de 5 minutos a 72°C. Las temperaturas de alineamiento, así como el tiempo de este último y de la extensión variaron según el caso. Los productos de la PCR 1 y PCR 2 de cada fragmento mutante se sometieron a una tercera reacción de PCR, en la que se mezclaron ambos *primers* candado, junto con 5 µl del producto de cada una de las reacciones de PCR 1 y PCR2. En algunas ocasiones, el volumen de las reacciones PCR1 y PCR2 se ajustó para mantener concentraciones equimolares de los productos de PCR en la PCR 3. Ejemplos de los amplicones obtenidos en cada una de las reacciones de PCR se muestran en la **Fig. 7**.

Posteriormente los fragmentos mutantes completos fueron ligados al vector pJet1.2/blunt del kit *CloneJET PCR Cloning* (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EUA). En los casos en los que se obtuvieron bandas inespecíficas en la PCR3, se realizó la purificación del fragmento de interés mediante el kit de purificación de DNA *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*, posteriormente se llevaron a cabo las reacciones de ligación en el vector pJet1.2/blunt a 22°C durante 30 min en un termobloque ThermoStat plus (Eppendorf, Leipzig, Alemania) en tubos Eppendorf que contenían de 2 a 3 µl de la reacción de PRC3, 10 µl de buffer de reacción 2X, 1 µl de T4 DNA ligasa, 1 µl de vector pJet1.2/blunt y de 5 a 6 µl de H₂O con una resistividad de 18.2 MΩ y libre de nucleasas.

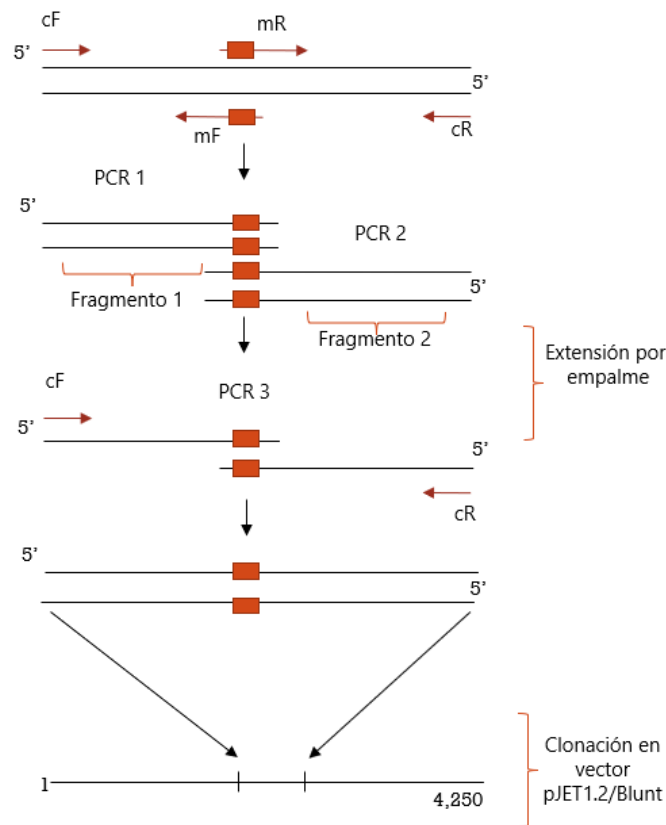


Figura 5. Mutagénesis dirigida por extensión del empalme por PCR. La estrategia experimental consiste en realizar dos reacciones de PCR simultáneamente. La PCR 1 que incluye el *primer* candado sentido (cF) y el *primer* mutagénico antisentido (mR), generando así el fragmento mutante 1 (cF-mR). La segunda reacción de PCR incluye el *primer* mutagénico sentido (mF) y el *primer* candado antisentido (cR), generando así el fragmento mutante 2 (mF-cR). La tercera PCR incluye los *primers* candado, así como los amplicones de la PCR 1 y 2, mismos que servirán como plantillas en la reacción de PCR 3. Como se muestra, ambos fragmentos se empalman entre sí por algunas pares de bases lo que inicia la extensión. El amplicón resultante de la PCR3 contiene la mutación en cuestión y se liga en el vector pJET1.2/Blunt. El fragmento mutante completo, se caracteriza por digestión enzimática, para posteriormente ligar este fragmento al vector completo o construcción intermedia, según fuera el caso.

Las reacciones de ligación se usaron para transformar bacterias *E. coli* TOP 10 con 7 µl de cada ligación mediante un choque térmico de 1 min a 42°C y 3 min de recuperación en hielo. Después se adicionaron 300 µl de medio SOC (para rápida y eficiente recuperación de las células competentes) y se incubaron en agitación constante a 37°C durante 1 h a 250 rpm. Finalmente, las bacterias fueron sembradas en placas de agar con medio Luria Bertani (LB) suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron a 37°C durante 14-16 h. Se eligieron 4-6 colonias al azar para re-siembra en medio líquido LB con ampicilina, incubándolas a 37°C en agitación a 270 rpm durante 16 h. Posteriormente se procedió a la extracción y purificación del DNA plasmídico mediante lisis alcalina convencional. Una vez purificado el DNA se procedió a corroborar la presencia del fragmento mutante mediante digestión enzimática y subsecuente análisis con electroforesis en geles de agarosa al 1%, para seleccionar las clonas que presentaran el tamaño correcto de dicho fragmento. Por último, el DNA plasmídico de las clonas positivas fue secuenciado en la UBM del IFC para corroborar la presencia de la mutación en cuestión, así como la ausencia de cualquier otra mutación indeseada.

Para el caso de las construcciones del Dominio I (DI), después de subclonar el fragmento mutante en el vector pJet1.2/blunt, se escindió el fragmento *Sbf* I – *Nhe* I con las enzimas respectivas para ser ligado en el canal completo, es decir, en el pcDNA3.1+Cav3.1 (ver **Fig. 8**). Para tal propósito, ambas construcciones fueron digeridas usando dos unidades de cada enzima, 1 µl de buffer 10X CutSmart (CS), 3 µl del DNA plasmídico de cada clona y 5 µl de ddH₂O. El fragmento de 917 pares de bases flanqueado por los sitios de corte de las enzimas *Sbf* I y *Nhe* I fueron ligados en los mismos sitios de pcDNA3.1+Cav3.1, para obtener así las mutantes correspondientes (T352A y T352R).

En el caso de las construcciones del Dominio II (DII) se usaron los sitios de corte de las enzimas *Xho* I – *Nsi* I. Sin embargo, debido a que estos sitios no son únicos en la construcción pcDNA3.1+Cav3.1, se recurrió a una construcción intermedia que contiene el fragmento *Kpn*I (954) - *Kpn*I (8082) del canal Cav3.1 clonado en el vector pUC19 (pUC19+Cav3.1-*Kpn*I) (ver **Fig. 9**). En esta construcción se subclonaron los fragmentos mutantes flanqueados por los sitios de reconocimiento de las enzimas *Nsi* I y *Xho* I mediante la metodología descrita en el párrafo anterior pero ahora utilizando estas enzimas. Las construcciones finales en el plásmido pcDNA3.1+Cav3.1 se obtuvo mediante

la escisión del fragmento *Kpn* I de pUC19+Cav3.1-*Kpn*I y su ligación correspondiente en el canal completo, pcDNA3.1+Cav3.1.

4.3. Cultivo de células HEK-293

Los cultivos celulares usados en el presente trabajo fueron células HEK-293, células epiteliales provenientes de riñón de un embrión humano. Las células HEK-293 son adecuados para expresión heteróloga, presentan alta tasa de crecimiento, alta eficiencia de transfección, poseen todos los modificadores postraduccionales de células humanas, por lo tanto, son capaces de producir proteínas más similares a las sintetizadas nativamente; aún más importante, no expresan corrientes endógenas de calcio. Las células HEK-293 crecen de forma adherente en monocapa, por lo que para este proyecto se manejaron las condiciones estándar de incubación, 37°C, un ambiente con 95% de O₂ y 5% de CO₂ en cajas Petri de plástico de 100 mm, en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO, Carlsband, CA, EUA), suplementado con 10% de suero fetal bovino y 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (GIBCO).

4.4. Transfección de células HEK-293 con los canales Cav3.1

Las transfecciones llevadas a cabo en este proyecto fueron de tipo transitorio realizadas en cajas Petri de 35 mm. Las células fueron sembradas 24 h antes de la transfección, al momento de está las células se encontraban a un 60-70% de confluencia. Las células fueron transfectadas con el cDNA de la subunidad α 1G (canal Cav3.1) y el cDNA de la proteína verde fluorescente (GFP) que sirvió como gen reportero, utilizando el agente transfectante PEI (*Polyethyleneimine*; Santa Cruz Biotechnology; Dallas, TX, EUA). La proporción utilizada para las transfecciones fue de 3:1, PEI:DNA. Después de 24 h de iniciada la transfección, las células fueron despegadas y resembradas para los registros electrofisiológicos. Primero, se retiró el medio de cultivo, posteriormente se realizó un lavado con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS), posterior a esto las células fueron despegadas usando 150 µl de tripsina-EDTA 0.05% a 37°C durante 5 min, al término de la cual se adiciono 1 ml de medio DMEM completo y las células fueron disgregadas mecánicamente con la ayuda de una micropipeta de 1 ml. De esta suspensión celular se sembraron aproximadamente 150-200 µl en cajas Petri de 35 mm que contenían cubreobjetos de vidrio (de alrededor de 25 mm² de área) en el fondo y 1.8 ml de medio

DMEM completo. Las células se mantuvieron en condiciones de incubación a 37°C durante al menos dos horas antes de comenzar los registros electrofisiológicos. Las células se utilizaron desde las 24 y hasta las 72 h después de la transfección.

4.5. Experimentos electrofisiológicos

En el presente trabajo se empleó la técnica de *patch-clamp* en la configuración de célula completa (*Whole-cell patch-clamp*) para estudiar las corrientes macroscópicas de los canales Cav3.1 silvestre (WT) y sus mutantes. El set up de registro en que se llevaron a cabo los experimentos electrofisiológicos consistió en un amplificador Axopatch 200B, conectado a una interfaz Digidata 1322 A/D, la cual convierte las señales digitales (provenientes de una computadora) a analógicas para que el amplificador de *patch-clamp* las envíe a la célula, y así mismo, la interfaz convierte las señales analógicas provenientes de las células en señales digitales que se pueden almacenar en la computadora. Esta última está habilitada con el software pClamp 9.02, cuya carpeta Clampex permite el diseño y aplicación de diferentes protocolos de voltaje para el análisis de corrientes, así como la fijación del potencial de mantenimiento según lo requiera el experimento. Las señales de corriente almacenadas en la computadora pueden ser analizadas posteriormente con la carpeta de Clampfit también del software pClamp. El amplificador, la interfaz y el software se adquirieron de Molecular Devices (Sunnyvale, CA, EUA).

La técnica de *patch-clamp* consiste en la formación de un sello de alta resistencia eléctrica, en el orden de Giga ohmios ($G\Omega$), entre la pipeta de registro (o electrodo de registro) y la superficie de la membrana celular, es por ello que también se le conoce como técnica de los gigasellos. El propósito último del gigasello es el de aislar eléctricamente una pequeña área de la membrana. Este sello se alcanza posicionando la pipeta de registro sobre la superficie de la membrana y aplicando presión negativa (succión) a través de la pipeta. Durante la formación de sello, la resistencia es monitoreada continuamente aplicando un pulso de 5 mV al electrodo. Una vez establecido el sello ($>1G\Omega$), se aplica un voltaje que mantiene el potencial de membrana (V_m) en un valor fijo, mismo que se denomina potencial de mantenimiento (HP). En el presente trabajo este valor de HP fue siempre de -100 mV. Inmediatamente después se procede a romper el parche de membrana ubicado en la boca

de la pipeta de registro (la cual tiene alrededor de 0.5-1.0 μM de diámetro), lo cual permite establecer la continuidad entre el interior de la pipeta de registro y el interior celular. En consecuencia, el contenido intracelular se equilibra casi instantáneamente con la solución interna contenida en la pipeta de registro y, en segundo lugar, dicha continuidad permite controlar (fijar) el voltaje del interior de la célula, y así medir la corriente generada por la actividad de los canales iónicos presentes en la membrana, usando diferentes protocolos de voltaje.

Previo a la aplicación de los protocolos de voltaje, se cancelan los transitorios capacitivos asociados a la capacitancia de la membrana (C_m) y la resistencia en serie (R_s) del sistema (resistencia del electrodo de registro más la resistencia de acceso a la célula), utilizando los potenciómetros correspondientes del amplificador de *patch-clamp* (*whole-cell parameters*).

Antes de iniciar el experimento propiamente, se colocó un cubreobjetos con células HEK-293 transfectadas y sembradas el mismo día sobre la cámara de registro, que se encuentra en la platina de un microscopio invertido (modelo Eclipse TE300 o Elipse TE200, Nikon, Japón). Las células fueron visualizadas en un aumento de 200X y el sello se realizó con un aumento de 300X. Todos los registros se llevaron a cabo a temperaturas de 20 a 23°C, y se mantuvo un flujo constante de la solución externa (2 ml/min), así mismo para mantener en estado óptimo a las células, los cubreobjetos fueron reemplazados después de no más de una hora de trabajo o una vez aplicado el fármaco (mibefradil).

4.5.1. Protocolos de voltaje

Se utilizaron varios protocolos de voltaje para estudiar el efecto de las mutaciones en las propiedades biofísicas del canal Cav3.1-WT, así como para investigar el efecto de las mutaciones en la inhibición de la corriente por mibefradil en relación con el canal Cav3.1-WT. A menos que se indique lo contrario, todos los protocolos se aplicaron a partir de potencial de mantenimiento de -100mV. A continuación se describen estos protocolos:

Sp-20-200: Este protocolo consiste en un pulso despolarizante a -20 mV, aunque algunas veces fue necesario cambiar a -10 o -30 mV para alcanzar la máxima amplitud de corriente entrante. Este valor también se modifica según el acarreador de carga (Ca^{2+} o Ba^{2+}) y la concentración de este último. La despolarización tuvo una duración de 200 milisegundos

(ms) y el pulso se repitió cada 10 s. Este protocolo se utilizó para monitorear la amplitud de la corriente de calcio y sus modificaciones ante la aplicación del fármaco en la cámara de registro.

IV-200: Este protocolo consiste en la aplicación de pulsos despolarizantes de 200 ms de duración que van desde -80 hasta +80 mV en incrementos de 10 mV, que se aplican cada 7 s. Este protocolo permite obtener la información referente a la activación de la corriente de los canales en función del voltaje con la que se construyen las curvas corriente-voltaje (*I-V*).

Hinf10ms-100: Este protocolo está diseñado para cuantificar la inactivación en el estado estacionario de los canales en cuestión mediante la aplicación de dos pulsos de voltaje. El primero, un prepulso de 10 s de duración a diferentes valores de V_m , desde -110 hasta -40 mV. El segundo es un pulso de prueba a -30 mV con duración de 200 ms. La función del primer pulso es promover la transición de los canales del estado cerrado (reposo) al estado inactivado y es de larga duración para asegurar que todos los canales que se inactiven a ese valor de V_m transiten a dicho estado, de ahí el nombre de inactivación en el estado estacionario. El segundo pulso evoca la corriente de calcio generada por los canales que no se inactivaron durante el prepulso. Usualmente se grafican los resultados normalizando la amplitud de las corrientes registradas a -30 mV en función del voltaje del prepulso.

Recover-100: Mediante el empleo de este protocolo se estudió la cinética de recuperación de los canales del estado inactivado. Desde -100 mV, se aplican dos pulsos de voltaje a -30 mV con duraciones de 200 y 30 ms, respectivamente. El segundo pulso se aplica a diferentes intervalos de tiempo que varían entre 1 y 2000 ms. La amplitud de la corriente del segundo pulso se normalizo respecto al primero y se grafican en relación con el intervalo de tiempo entre ambos pulsos.

IIV2ms60-2ch: Este protocolo se emplea para estudiar la desactivación o cierre de los canales Cav3.1. A partir del HP de -100 mV se aplica un pulso de corta duración (solo 2 ms) a +60 mV con la finalidad de activar prácticamente todos los canales presentes en la membrana, pero sin permitir que se inactiven. Posteriormente, la membrana es repolarizada con pulsos desde -120 hasta +80 mV, en incrementos de 10 mV con duración

de 40 ms. Este protocolo de voltaje genera colas de corriente, las cuales reflejan el cierre de los canales que fueron abiertos por el pulso a +60 mV. Al realizar el gráfico de la amplitud de cada una de las colas de corriente en función del potencial de repolarización se pueden construir curvas *I-V* instantáneas (haciendo referencia a la corriente “instantánea” generada por los canales abiertos a +60 mV al momento de repolarizar a diferentes voltajes). Además, el ajuste de cada una de las colas de corriente con funciones exponenciales permite determinar el curso temporal con el que se cierran los canales.

4.5.2. Soluciones de registro

En todos los registros electrofisiológicos se empleó una única solución externa, cuya composición es la siguiente (en mM): 155 TEA-Cl (Cloruro de Tetra Etil Amonio), 10 HEPES y 5 CaCl₂. El pH de la solución se ajustó a 7.3 con TEA-OH. La osmolaridad fue alrededor de 310 mOsm. Por su parte, la solución interna con la que llenan las pipetas de registro tuvo dos composiciones: Solución Interna 1, la que más se usó, suplementada con 4 mM Mg-ATP y 0.3 mM Tris-GTP para evitar el “rundown” de la corriente de calcio. La Solución interna 2 fue utilizada cuando las corrientes expresadas por las células eran muy pequeñas, y por lo tanto era necesario asegurarse que la corriente de fuga fuera aún más pequeña durante el registro, lo cual se favorece por la presencia del CsF en esta solución. La composición base de ambas soluciones fue como sigue (en mM): Solución interna 1: 130 CsCl, 2 CaCl₂, 10 EGTA, 1 MgCl₂ y 10 HEPES. Solución interna 2: 118 CsCl, 20 CsF, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 EGTA y 10 HEPES. Para ambas soluciones el pH fue ajustado a 7.3 con CsOH y la osmolaridad rondó los 300 mOsm.

4.5.3. Electrodo de registro

Las pipetas o electrodos de registro se construyeron a partir de capilares de borosilicato (TW150-3, World Precision Instruments; Sarasota, FL, EUA) utilizando un estirador horizontal (Sutter instruments; Novato, CA, EUA) y pulidos al calor con la ayuda de una microforja MF-830 (Narishige Co; Japón), esto con el fin de eliminar imperfecciones en la superficie del electrodo que pudieran dañar la membrana celular durante la realización del sello. Las resistencias de los electrodos variaron de 2 a 3 MΩ una vez llenas con la solución interna respectiva.

4.6. Análisis de los datos

Los registros de corriente obtenidos en los experimentos de *patch-clamp* fueron analizados en el software Clampfit de pClamp 10.4 en combinación con los programas Office Excel 2007 y Prism 9 (GraphPad Software; San Diego, CA, EUA). Todos los resultados se expresan como el promedio \pm el error estándar. Se utilizó la prueba estadística *t de Student* para comparar las diferencias entre grupos, considerando una $P < 0.05$ con un intervalo de 95% de confianza para considerar diferencias significativas entre los grupos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. *Docking*: aproximaciones iniciales

Como ya se explicó en la sección 3.1 de métodos, se realizaron ensayos de acomplamiento molecular (*docking*) para buscar aminoácidos candidatos que pudieran formar el sitio de unión del mibefradil en el canal Cav3.1. Los resultados obtenidos mediante las simulaciones de *docking* proporcionan el modo o modos de unión que adopta un ligando en un espacio de búsqueda definido en la proteína de interés. Para determinar la importancia de cierto aminoácido en la unión de un ligando *in silico*, se sustituye éste por una Alanina (Ala o A) con la finalidad de modificar la energía de formación de enlace (entalpía) o disminuir la energía libre de Gibbs. La sustitución por residuos de Ala elimina las interacciones de la cadena lateral del aminoácido reemplazado, más allá del carbono, sin alterar la conformación de cadena principal o introducir efectos estéricos o electrostáticos, por lo tanto, esta sustitución es la mutación más neutra, estructuralmente hablando. Además de la sustitución por Ala, también se realizaron mutaciones por Arginina (Arg o R), la intención de esta mutación fue introducir una alteración local más drástica en el sitio de unión del mibefradil, esto dado el volumen de su cadena lateral y las posibles interacciones que pudiera introducir en los aminoácidos contiguos.

Los aminoácidos propuestos por el *docking* para formar el sitio de unión del mibefradil en el modelo de Cav3.1 (Cav3.1-203IFC) fueron cuatro: T352 del Dominio I y T949, Y953, y F956 del Dominio II (**Fig. 6**).

5.2 Construcción de los canales Cav3.1 mutantes

Las construcciones moleculares de los canales mutantes Cav3.1 se generaron por mutagénesis sitio dirigida empleando la técnica de extensión del empalme por PCR. En la **Fig. 7** se muestran fotos de los gels de agarosa al 1% con las bandas obtenidas de las tres reacciones de PCR para obtener los fragmentos mutantes tanto del Dominio I y Dominio II. Los fragmentos generados fueron ligados en el vector pJET1.2/blunt para ser amplificados y verificar su identidad molecular por digestión enzimática y secuenciación.

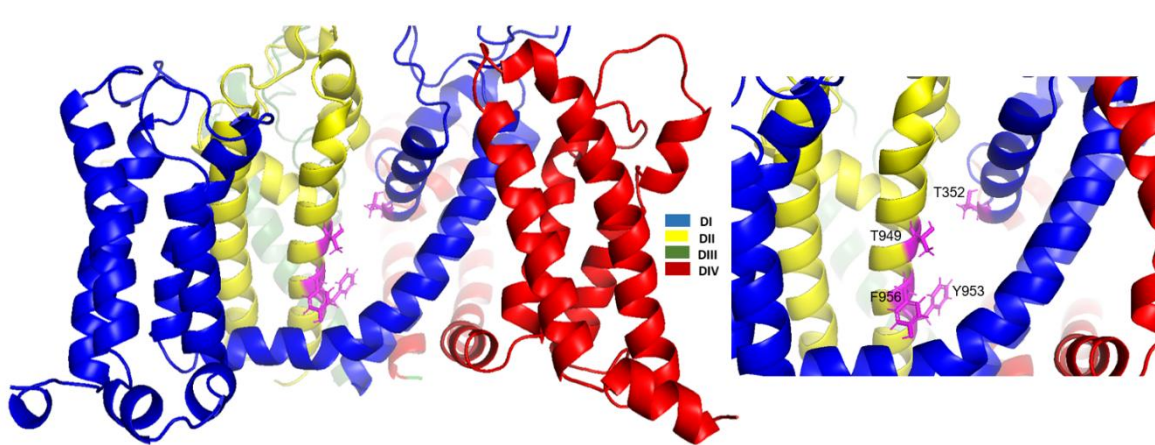


Figura 6. Interacción del mibefradil con aminoácidos del canal Cav3.1. Modelo de los 24 segmentos transmembranales de canal Cav3.1 y las asas que los unen. Se presentan los aminoácidos candidatos de las primeras simulaciones de *docking* utilizando el modelo Cav3.1-203IFC. De los aminoácidos T949 y F956 se obtuvieron las construcciones de los canales mutantes, sin embargo, no generaron corrientes medibles. La mutación por Ala en el sitio T352 no afectó el porcentaje de bloqueo del mibefradil, indicativo de no formar parte del sitio de unión.

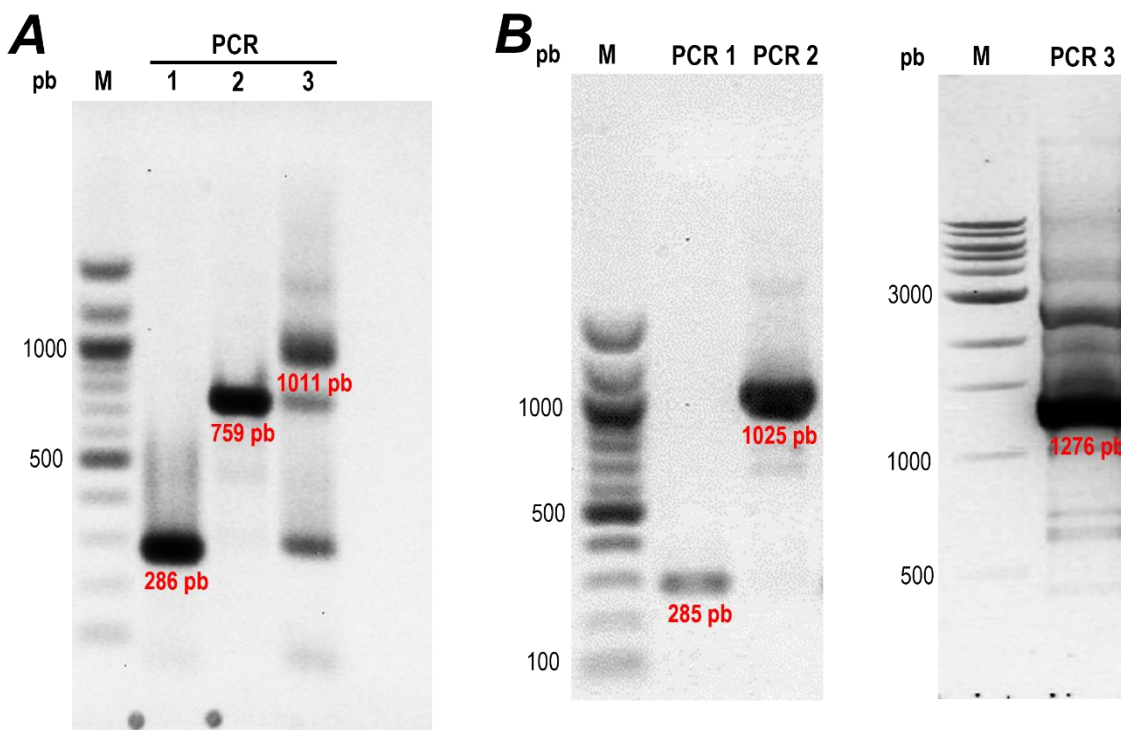


Figura 7. Fragmentos mutantes de las construcciones del Dominio I y II del canal Cav3.1. Análisis electroforético de las reacciones de PCR diseñadas para obtener los fragmentos mutantes (PCR 3 en cada panel) por extensión del empalme a partir de los amplicones de la PCR1 y PCR2. Se muestran los geles de agarosa al 1% con los productos para las mutantes del segmento 6 del Dominio I (**A**) y del Dominio II (**B**). M, marcador de peso molecular. pb, pares de bases. El tamaño de los productos de interés se indica en color rojo justo debajo de la banda en cuestión.

5.2.1. Construcción de canales mutantes del DIS6

Para las mutaciones generadas en el IIS6 se usaron los sitios únicos de las enzimas *Sbf*I y *Nhe*I. Una vez corroborada la identidad molecular del fragmento, este fue ligado en el canal completo Cav3.1-WT mediante digestión enzimática con estas enzimas, digiriendo el canal completo Cav3.1-WT y las mutantes T352A y T352R contenidas en el vector Jet1.2/blunt, generando fragmentos de 3,068 y 917 pb respectivamente (**Fig. 8**). Ambos fragmentos se ligaron con 1 ul de ligasa, como se describe en la sección de métodos.

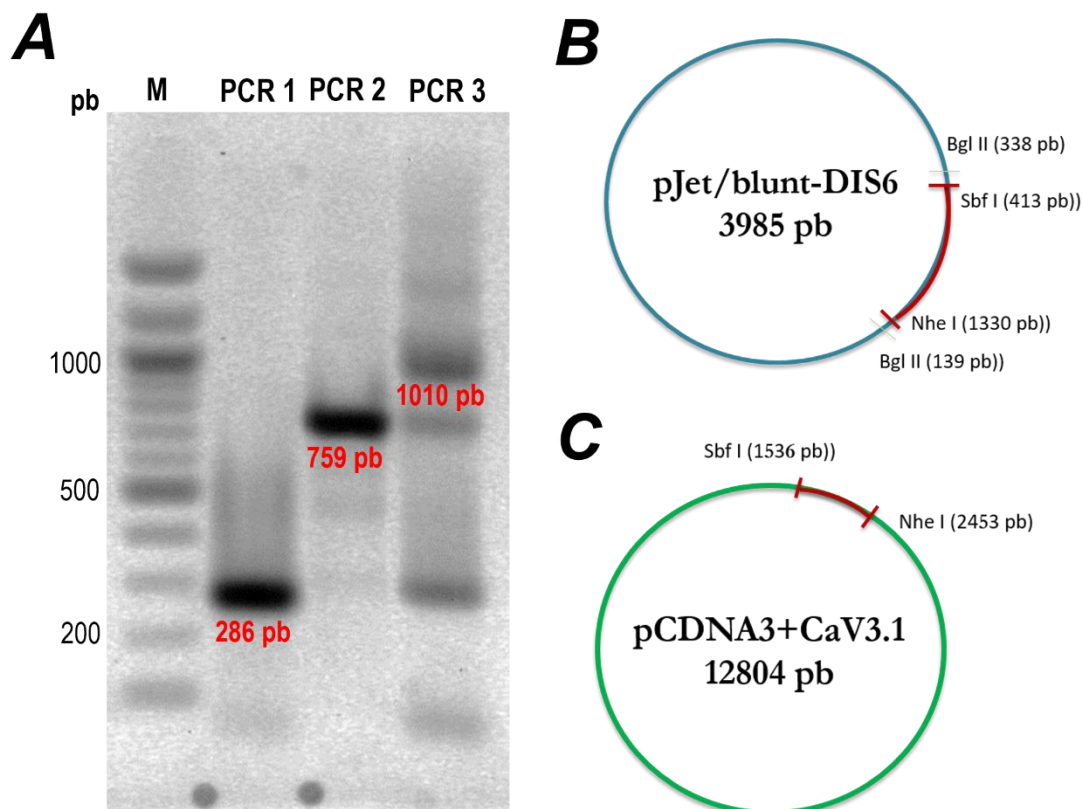


Figura 8. Estrategia para la construcción de mutantes del segmento IS6 del canal Cav3.1. El fragmento resultante de la PCR3 de 1,011 pb (**A**) se ligó en pJet1.2/Blunt en los sitios *Bgl* II (**B**). Posteriormente se utilizaron los sitios *Sbf* I y *Nhe* I para introducir el fragmento mutante en el canal Cav3.1-WT (plásmido pCDNA3.1+CaV3.1 de 12,804 pb) (**C**).

5.2.2 Construcción de canales mutantes del DIIS6

Para las construcciones moleculares del DIIS6 se usaron los sitios de corte de las enzimas *Nsi*I y *Xho*II, las cuales flanquean los fragmentos mutantes. No obstante, existen sitios de corte adicionales de dichas enzimas en el plásmido de Cav3.1-WT, razón por la cual se

utilizó una construcción intermedia en el proceso de generación de los canales mutantes de este Dominio II. Esta construcción intermedia contiene el fragmento *KpnI* de canal Cav3.1-WT clonado en el polilinker del vector pUC19. De esta manera el fragmento *NsiI* - *XhoI* (1022 pb) de cada mutante fue ligado a dicho vector; posteriormente, se procedió a escindir el fragmento completo de *KpnI* (7128 pb) de pUC19 conteniendo el fragmento mutante *NsiI* - *XhoI*, el cual fue ligado al canal completo como se muestra en la **Fig. 9**.

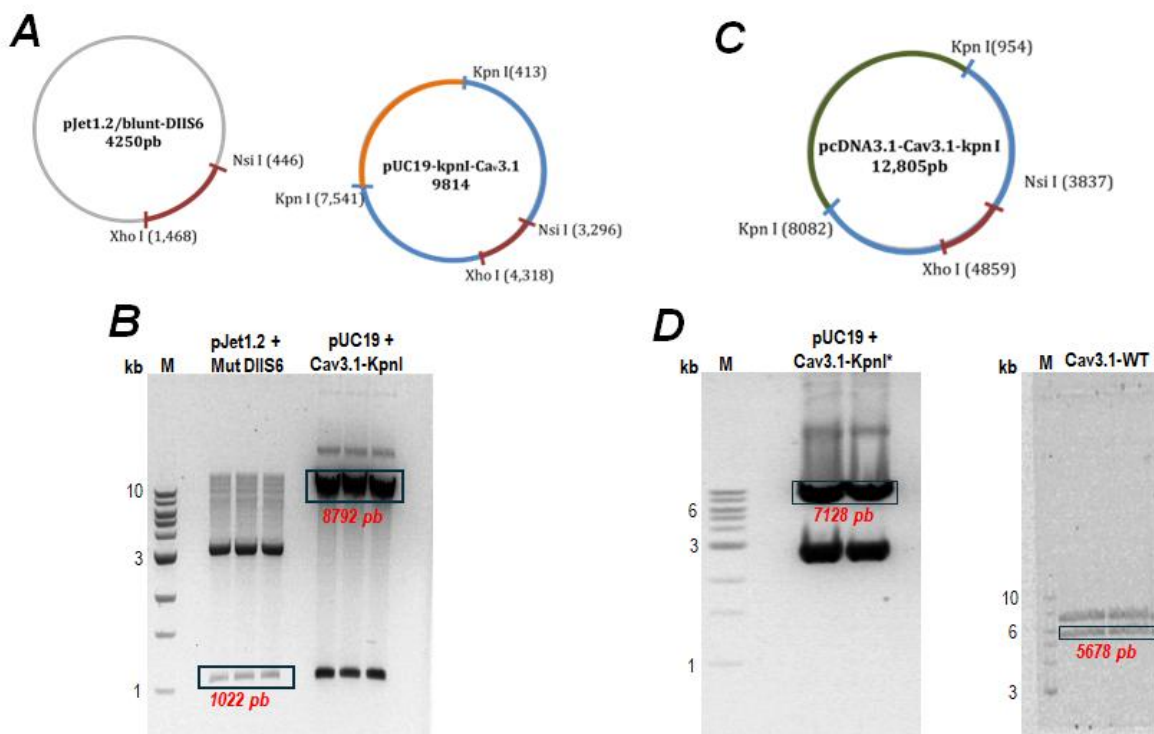


Figura 9. Estrategia para la construcción de mutantes del Dominio II. **A)** Los fragmentos mutantes obtenidos en la PCR3 fueron ligados en el vector de expresión pJet1.2/Blunt generando plásmidos de 4,250 pb. El fragmento *NsiI* - *XhoI* de este vector (resaltado en color guinda) se intercambió en la construcción intermedia pUC19+Cav3.1-KpnI (9,814 pb). **B)** Gel de agarosa que muestra las bandas obtenidas de la digestión con *NsiI* - *XhoI* de pJet1.2/Blunt-DIIS6 y el plásmido pUC19+Cav3.1-KpnI. Las bandas que se recuperaron para la ligación fueron de 1,022 y 8,792, respectivamente. **C)** Construcción final que se obtuvo ligando el fragmento *KpnI* - *KpnI* de 7,128 pb del plásmido pUC19+ Cav3.1-KpnI* (conteniendo el fragmento mutante), y el fragmento de 5,678 pb obtenido de la digestión con la misma enzima del plásmido pCDNA3+Cav3.1-WT. **D)** Geles de agarosa que muestran la banda de 7,128 pb del plásmido pUC119+Cav3.1-KpnI* y la banda de 5,678 pb de pCDNA3.1+Cav3.1-WT, para posteriormente ser ligados y dar lugar al canal Cav3.1 mutante respectivo, como ya se describió en la metodología. M, marcador de peso molecular; kb, pares de bases x1000.

De estos experimentos de mutagénesis se obtuvieron un total de 4 construcciones mutantes, T949A, T949R, F956A y T352A. No fue posible obtener las mutantes T352R, Y953A, Y953R ni F956R durante las reacciones de PCR. Además, de las construcciones obtenidas, las mutantes T949A, T949R y F956A no presentaron corrientes medibles con la técnica de *patch-clamp*, por lo que no fue posible evaluar el efecto de mibefradil en estos aminoácidos. La única construcción que presentó corrientes medibles fue la T352A, de cual se caracterizaron sus propiedades biofísicas y sensibilidad al mibefradil (véase más adelante). No obstante, es pertinente mencionar que este aminoácido no parece formar parte del sitio de unión del mibefradil.

Ahora bien, el hecho de que las construcciones T949A y F956A no presentaran corrientes medibles, resultó un tanto inesperado, pues como ya se explicó anteriormente en la sección 4.2., la sustitución por este aminoácido no produce cambios estructurales significativos en la cadena lateral de la α -hélice, por lo que no se esperarían alteraciones en la función de la proteína. Es importante mencionar que la posibilidad de una mutación no deseada en dichas mutantes no es la explicación pues los fragmentos mutantes fueron secuenciados (ambas hebras del DNA) para constatar su identidad molecular y no se encontraron cambios adicionales a la mutación deseada *per se*. No obstante, tanto la T949 como la F956 parecen formar parte de la fenestración del Dominio I y IV (**Fig. 10**).

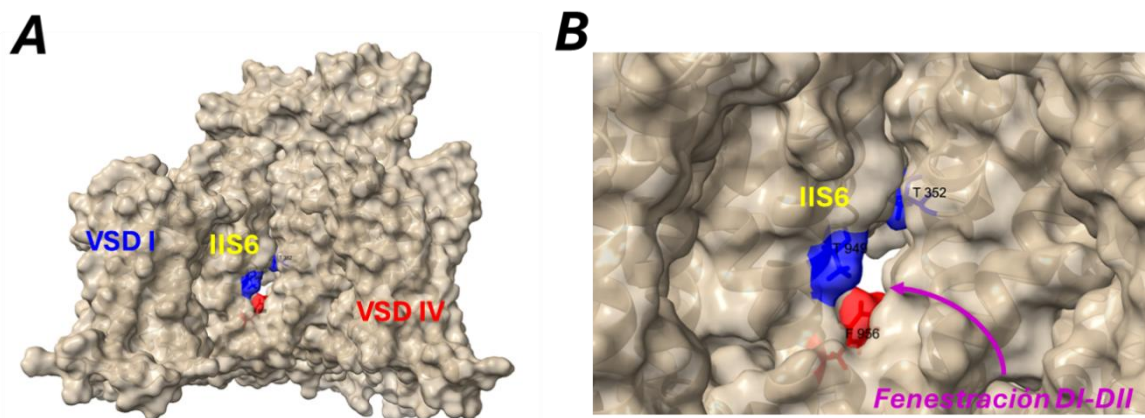


Figura. 10. Ubicación de los aminoácidos T949 y F956 en la fenestración I-II del canal Ca_v3.1. Representación de superficie del canal Ca_v3.1 (Cav3.1-203IFC) mostrando la ubicación de T949 y F956, cuyas mutaciones no expresaron corrientes de calcio medibles con la técnica de *patch-clamp*. Figura preparada con ChimeraX.

Es probable entonces que los cambios introducidos por la presencia de la Ala en esta posición modifiquen el plegamiento del canal y que este no sea traslocado a la membrana o que, si llegue a ésta, pero que los cambios introducidos por la Ala sean suficientes para que el canal no funcione correctamente. Con base en estos argumentos, es esperable que la mutación de T949 por Arg (T949R) tampoco genere corrientes pues este aminoácido introduce cambios estructurales aún más drásticos debido a su carga neta positiva y a la cadena lateral más larga que ésta posee. Para poner a prueba estas dos propuestas, se necesitaría realizar una proteína de fusión con dichas mutantes y la proteína verde fluorescente (GFP) de tal manera que se pueda monitorear la sublocalización celular de dichas mutantes. Esta es una interrogante que se investigara en subsecuentes investigaciones en nuestro laboratorio.

Teniendo en cuenta lo anteriormente señalado, no se pudo concluir sobre la precisión de los ensayos de *docking* realizados con el modelo de Cav3.1 generado en el laboratorio pues únicamente se puso a prueba una construcción; sin embargo, con base en los resultados y debido a que en el laboratorio existían construcciones de aminoácidos cercanos al sitio propuesto por los ensayos de *docking* se procedió a evaluar algunas de estas mutantes.

5.3. Efecto antagonista del mibefradil en los canales Cav3.1

El canal silvestre (Cav3.1-WT) y sus mutantes se expresaron en células HEK-293 mediante transfecciones transitorias y su actividad se registró mediante la técnica de *patch-clamp* en configuración de célula completa. Utilizando una solución externa de registro con 5 mM de Ca²⁺ como acarreador de carga, en el presente trabajo se estableció una concentración de 500 nM de mibefradil para alcanzar un bloqueo estable de aproximadamente 69% de la corriente del canal Cav3.1-WT. Esta concentración de mibefradil, permitió examinar de manera adecuada los cambios en el porcentaje de bloqueo de las corrientes de los canales mutantes.

En la **Fig. 11** se ejemplifica un experimento representativo de la evaluación del fármaco en el canal Cav3.1-WT y un resumen de los resultados obtenidos con varias de la mutantes de este canal. En el panel A se ilustran los trazos de corriente evocados a -30 mV (con el protocolo *sp-100*, previamente descrito) en la condición Control (solución 39), en presencia

de 500 nM de mibefradil (solución 39 + 500 nM de mibefradil), y después de retirar el fármaco de la cámara de registro Lavado (solución 39). El curso temporal con el que se desarrolló el experimento se presenta en el panel B. La corriente al pico de cada registro de corriente a -30 mV se normalizó respecto al valor máximo de corriente al pico registrado en la condición Control. Al perfundir las células con la solución que contiene 500 nM de mibefradil la amplitud de la I_{Ca} disminuye gradualmente hasta alcanzar un valor estacionario cercano al 30% de la amplitud Control. Lo anterior sucede alrededor de 5 min después de iniciar la perfusión con mibefradil. Posteriormente, la corriente se recupera (alrededor de un 80% del total) después de lavar el fármaco de la cámara de registro con la solución control nuevamente. El porcentaje promedio de I_{Ca} que fue inhibida por el mibefradil en el canal WT fue de $69 \pm 1.2 \%$ ($n = 37$). En el panel C se comparan los porcentajes de bloqueo de varias mutantes del canal Cav3.1 del Dominio I con el observado en el canal Cav3.1-WT.

Como se mencionó anteriormente, la mutante T352A no parece formar parte del sitio de unión del mibefradil, sin embargo, se decidió estudiar sitios cercanos de mutantes disponibles en el laboratorio, analizando un total de 16 construcciones de 12 sitios distintos. Las mutantes F384A y F384R muestran una disminución significativa en el porcentaje de bloqueo con 45 ± 3.8 y $40 \pm 3.4\%$, respectivamente, respecto al $69 \pm 1.2 \%$ observado en el canal silvestre (**Fig. 11C**). El resto de las mutantes estudiadas del Dominio I no mostraron cambios significativos o, por el contrario, presentaron un bloqueo más pronunciado que el canal silvestre. Tal fue el caso de las mutantes V381A y, más evidente, el de la F385A. Este aminoácido se ubica en la entrada a la fenestración IV-I (**Fig. 12**) por lo que el cambio de una Phe por una Ala se refleja en una disminución del volumen estructural de la fenestración y de esta manera podría facilitar la entrada del mibefradil a su sitio de unión. El discreto aumento en el bloqueo observado con la mutante V381A se explica de la misma manera pues este aminoácido se encuentra 4 posiciones arriba de la Phe, ambas orientadas hacia la entrada a la fenestración IV-I (**Fig. 12**).

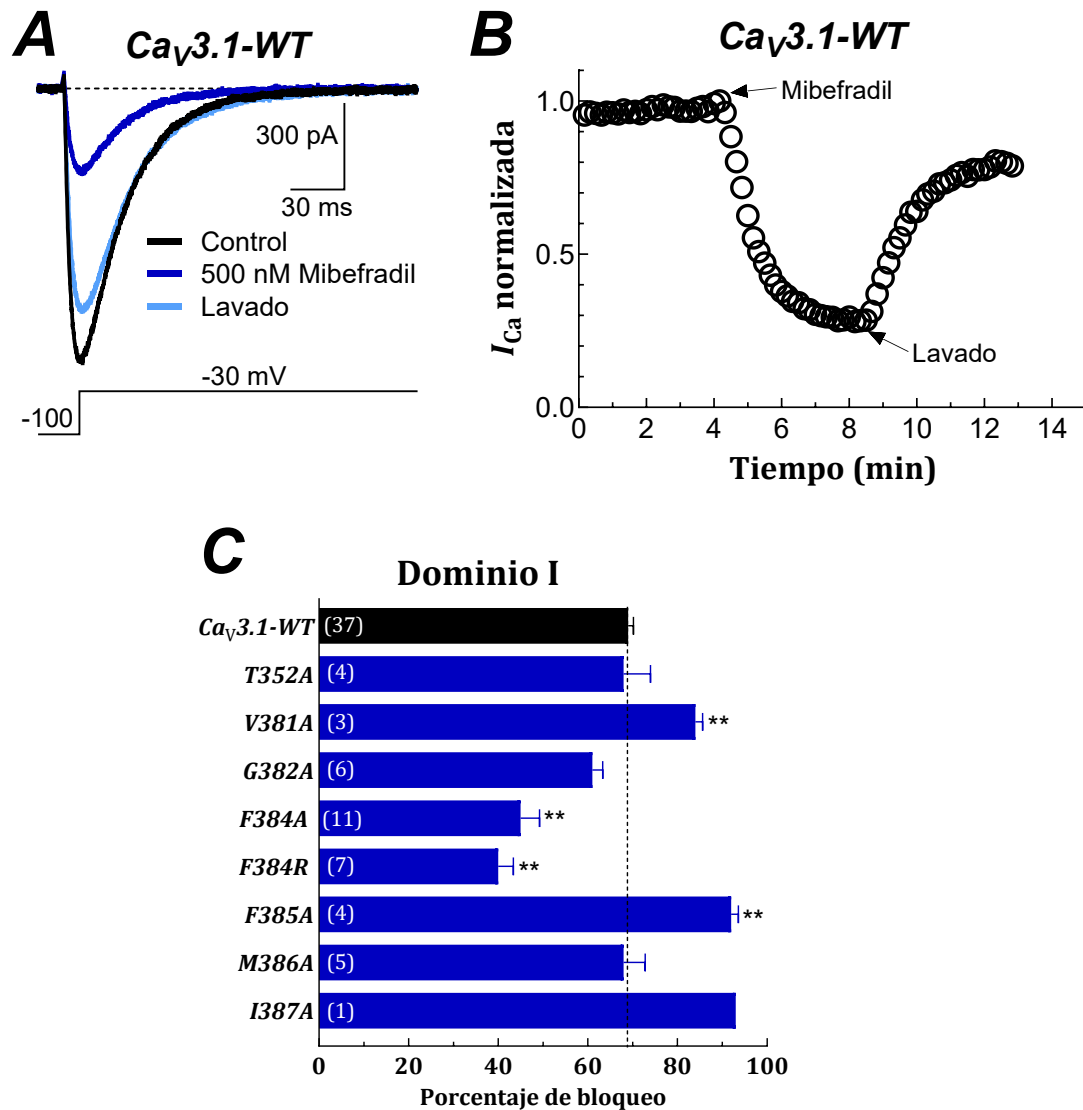


Figura 11. Evaluación del efecto inhibitorio de mibefradil en las mutantes del Dominio I del canal *Ca_v3.1*. **A)** Trazos representativos de la *I_{Ca}* evocados por pulsos despolarizantes a -30 mV, obtenidos del canal *Ca_v3.1-WT* en condiciones Control, 500 nM de mibefradil y Lavado, como se indica en la figura. **B)** Curso temporal de las variaciones de la *I_{Ca}* normalizada en función de las condiciones experimentales indicadas. **C)** Porcentaje de bloqueo de la *I_{Ca}* en presencia de 500 nM de mibefradil para los canales *Ca_v3.1-WT* y las mutantes del Dominio I. Los datos son el promedio \pm EE. En paréntesis blancos se indica el número de células investigadas para cada mutante. Las mutantes cuyo porcentaje de inhibición fue estadísticamente diferente con respecto al control (*Ca_v3.1-WT*) se distinguen con dos asteriscos ($p < 0.01$).

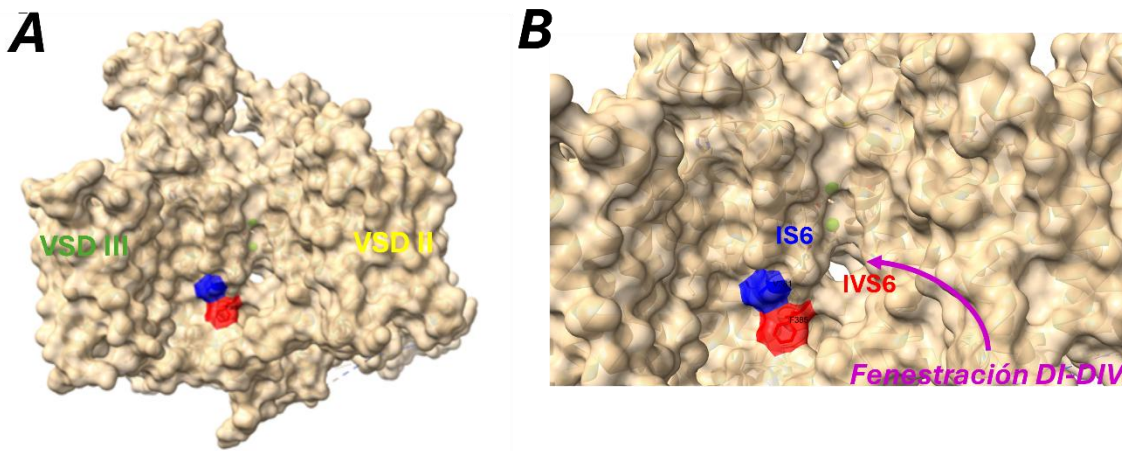


Figura 12. Ubicación del aminoácido F385 en la fenestración IV-I del canal Cav3.1. Representación de superficie del canal Cav_v3.1 (Cav_v3.1-203IFC) mostrando la ubicación de la V381 (resaltado en azul) y la F385 (resaltado en rojo), cuyas mutaciones por Ala provocaron un aumento en el porcentaje de bloqueo del mibefradil en comparación con el canal Cav_v3.1 silvestre. Figura preparada con ChimeraX.

5.3.1 Efecto antagonista del mibefradil en las mutantes del Dominio IV de los canales Cav3.1

En la **Fig. 13A y 13B** se muestran los trazos representativos del efecto del mibefradil en las mutantes V1809A y V1809G del canal Cav_v3.1, así como el curso temporal del bloqueo de la corriente evocada por 500 nM de mibefradil. En las dos mutantes estudiadas del sitio V1809 el mibefradil disminuyó su porcentaje de bloqueo de manera significativa, respecto al WT: de 69 ± 1.2 a 35 ± 2.9 y $15 \pm 1.8\%$ respectivamente (**Fig. 13C**). Estos resultados indican que las mutaciones de la Val 1809 independientemente del cambio de aminoácido, son capaces de disminuir la afinidad del mibefradil por su sitio de unión, lo que sugiere, que la Val 1809 por sí misma es importante en la unión del mibefradil y al canal Cav_v3.1. El efecto más drástico observado en la mutante V1809G, pudiera ser debido a que la Gly es el aminoácido más pequeño (con solo un átomo de hidrogeno como su cadena lateral) de los 20 que se encuentran en las proteínas de mamíferos. Por ello, la interacción del mibefradil con este aminoácido es prácticamente nula, lo que se refleja con un bloqueo muy débil.

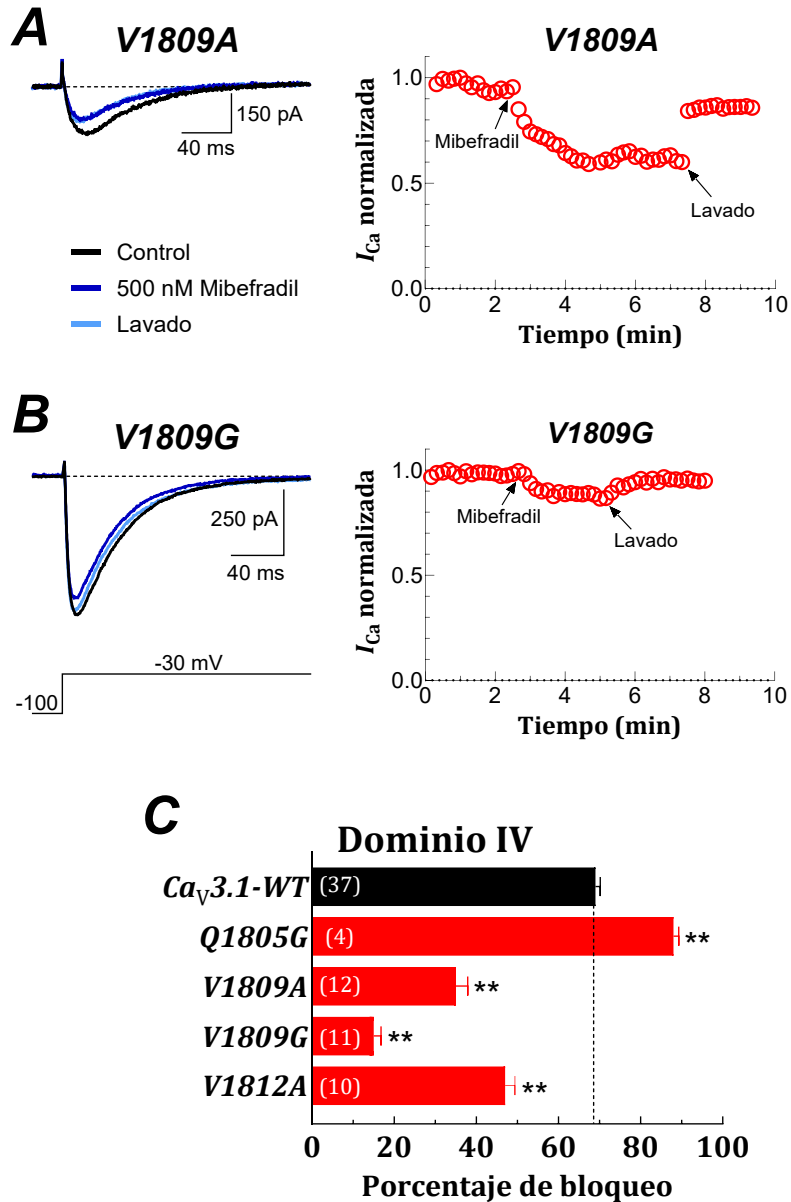


Figura 13. Efecto del mibefradil en las mutaciones de la V1809 del canal $Ca_v3.1$. A la izquierda se muestran trazos representativos de las I_{Ca} evocados por pulsos despolarizantes a -30 mV, obtenidos de los canales mutantes V1809A (**A**) y V1809G (**B**) en condiciones control (negro), perfusión con mibefradil 500 nM (azul marino) y lavado (azul claro). Las corrientes fueron evocadas cada 10 s con el protocolo indicado en el panel B. A la derecha, se muestra el curso temporal del bloqueo de las I_{Ca} por 500 nM de mibefradil de las mismas células mostradas en los registros de la izquierda. De manera general se requirieron 2 a 3 minutos para obtener una corriente estable en cada condición experimental. **C**) Porcentaje de bloqueo de la I_{Ca} en presencia de 500 nM de mibefradil para los canales indicados del Dominio IV. Los datos son el promedio \pm EE. Entre paréntesis, blancos se indica el número de células investigadas para cada construcción. Las mutantes cuyo porcentaje de inhibición fue estadísticamente diferente con respecto al control ($Ca_v3.1$ -WT) se distinguen con dos asteriscos ($p < 0.01$).

Por otro lado, la disminución en el porcentaje de bloqueo que se observa en la mutante V1812A es probable que se deba a que este aminoácido forma parte de la compuerta intracelular (31). Durante la despolarización el segmento S4 se mueve a través de la membrana, generando un cambio en la estructura del canal que conduce a su apertura, por lo tanto, la modificación en la Val 1812 podría estar interfiriendo en la activación del canal, pero no en la afinidad del mibefradil por su sitio de unión.

Como se mencionó en la introducción, el trabajo previo de Eduardo Chávez en nuestro laboratorio (69), encontró que la Gln 1805 es crucial para la unión del compuesto TTA-A2 en los canales Cav3 (**Fig. 4**). Interesantemente, las mutantes de dicho residuo por Ala, Pro no modificaron el efecto antagonista del Mibefradil observado en el canal Cav3.1 silvestre; solo la mutación por Arg disminuyó de manera significativa el porcentaje de bloqueo con respecto al canal silvestre. Lo anterior, como ya se explicó en esa sección no significa que la Gln1805 forme parte del sitio de unión del Mibefradil, más bien, que el cambio de dicho residuo por una Arg introduce cambios fisicoquímicos y electrostáticos que modifican drásticamente la hélice alfa en dicha región, lo cual se manifiesta como una disminución en el porcentaje de bloqueo del Mibefradil. Para aportar más evidencias de que la Gln 1805 no forma parte del sitio de unión del Mibefradil utilizamos la mutante Q1805G. Como se observa en la **Fig. 13C**, al sustituir la Gln por el residuo más pequeño de las proteínas, no solo no disminuyó el bloqueo del Mibefradil, como se esperaría si fuera parte del sitio de unión del Mibefradil. Por el contrario, el porcentaje de bloqueo aumentó de manera significativa hasta $88 \pm 1.3 \%$, es decir, 19% más que el observado en el canal silvestre.

Los resultados de la **Fig. 13** revelan uno de los aminoácidos más importantes en la interacción del mibefradil con la proteína del canal Cav3.1: la V1809, la cual se encuentra posicionada en el segmento S6 del dominio IV como se observa en la **Fig. 14**, se encuentra orientada hacia la región intracelular del canal muy cerca de la compuerta de activación.

A partir de estos resultados experimentales, y para aportar más información sobre el mecanismo de unión del mibefradil, se realizó un mapa de interacciones de acuerdo con los resultados experimentales obtenidos, generando así, un modelo tridimensional de la posible pose de unión del mibefradil en el Cav3.1, siguiendo el proceso descrito en la sección 3.1 de Metodología.

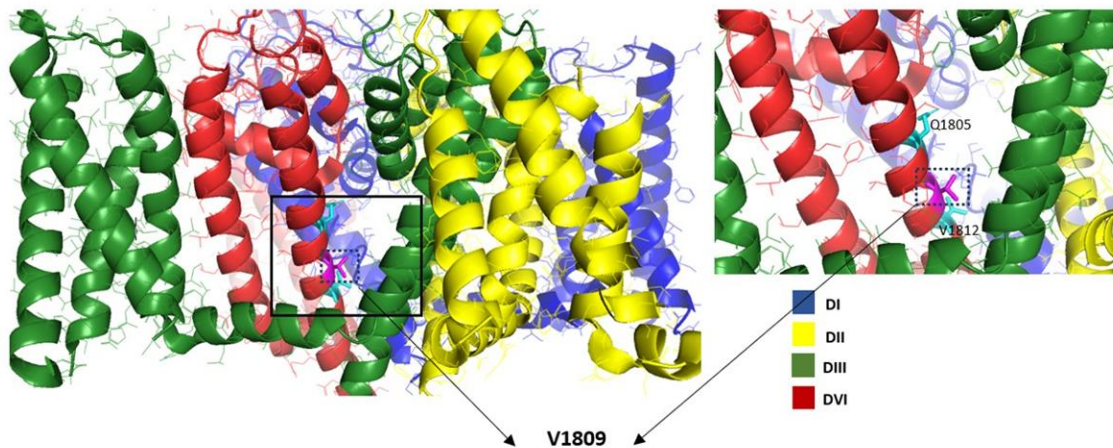


Figura 14. Modelo de los 24 segmentos transmembranales de la subunidad $\alpha 1$ del canal Cav3.1. La V1809 se ubica en el segmento S6 del Dominio IV del canal Cav3.1. El cuadro negro representa una aproximación del espacio de búsqueda definido mediante los resultados experimentales con la técnica de *patch-clamp*.

5.4. Propiedades biofísicas de los canales mutantes

En total se construyeron siete canales mutantes candidatos a formar parte del sitio de unión, T352A, T352R, F956A, T949A, T949R, F956A y V1809A (esta última construida previamente en el laboratorio del Dr. Gómora), y de las cuales únicamente la T352A y V1809A expresaron corrientes medibles, como se mencionó anteriormente. Por lo tanto, se consideró relevante caracterizar las propiedades biofísicas de dichas mutantes para conocer si existían propiedades biofísicas que distinguen a mutantes que forman parte del sitio de unión al mibefradil de aquellas que no lo son, así como para comparar con las propiedades del canal Cav3.1-WT.

5.4.1. Dependencia al voltaje de la activación

Para estudiar la dependencia al voltaje de la activación se generaron curvas corriente-voltaje ($I-V$), utilizando un protocolo de voltaje denominado IV-100, el cual, permite evaluar la dependencia de voltaje y la cinética de las corrientes en función del valor del potencial de membrana. Las corrientes registradas en respuesta a este protocolo presentaron un patrón característico de corrientes entrecruzadas (*criss-crossing*), en donde la amplitud de la corriente y su cinética (curso temporal) de activación e inactivación aumenta conforme se despolariza la membrana (**Fig. 15A**). El patrón de entrecruzamiento de las

corrientes puede variar en función de la concentración de Ca^{2+} extracelular; para los experimentos de caracterización biofísica de los canales mutantes se utilizó una concentración de 5 mM calcio en la solución externa de registro. En los registros de I_{Ca} ejemplificados para cada construcción se puede observar que la amplitud de corriente máxima se obtuvo a -20 mV, es decir, ninguna de las dos mutantes modificó la dependencia al voltaje de la activación de la I_{Ca} .

La amplitud de la corriente (pA) que se registra con la técnica de *patch-clamp* en la configuración de célula completa varía dependiendo del tamaño de cada célula, por lo que, con el propósito de eliminar esta variable, la amplitud de la corriente se dividió entre el valor de capacitancia (C_m) de la célula en cuestión, a cada uno de los voltajes estudiados. Considerando que la capacitancia específica de la mayoría de las membranas biológicas es de $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, el cociente que se obtiene es una medida de la cantidad de corriente que fluye por unidad de área de membrana (pA/pF), también conocido como densidad de corriente. En la **Fig. 15B** se grafica la densidad de corriente promedio a cada valor de V_m generada por los canales $\text{Cav}3.1$ indicados. Como se puede observar, la mutante T352A es la que presenta la densidad de corriente más baja en comparación con el canal $\text{Cav}3.1$ silvestre, mientras que la mutante V1809A expresó una densidad de corriente similar a la de este último. Con la finalidad de comparar de manera cuantitativa las posibles diferencias en la dependencia al voltaje de la activación de los canales mutantes con respecto al canal $\text{Cav}3.1$ -WT, se realizó una normalización de los valores de la densidad de corriente, se promediaron entre los grupos de células y se graficaron en función del valor de V_m . Los puntos experimentales se ajustaron con una ecuación de Boltzmann modificada (Ecuación 1) lo que proporcionó los parámetros $V_{1/2}$, k_{act} y V_{rev} , mostrados en la **Tabla 2**. Desplazamientos de las curvas I - V normalizadas hacia la izquierda o derecha indican variaciones en la dependencia al voltaje de activación; como se puede observar en la **Fig. 15B**, el desplazamiento más evidente se presentó en la mutante T352A, hacía potenciales más positivos, respecto a la del canal $\text{Cav}3.1$ -WT.

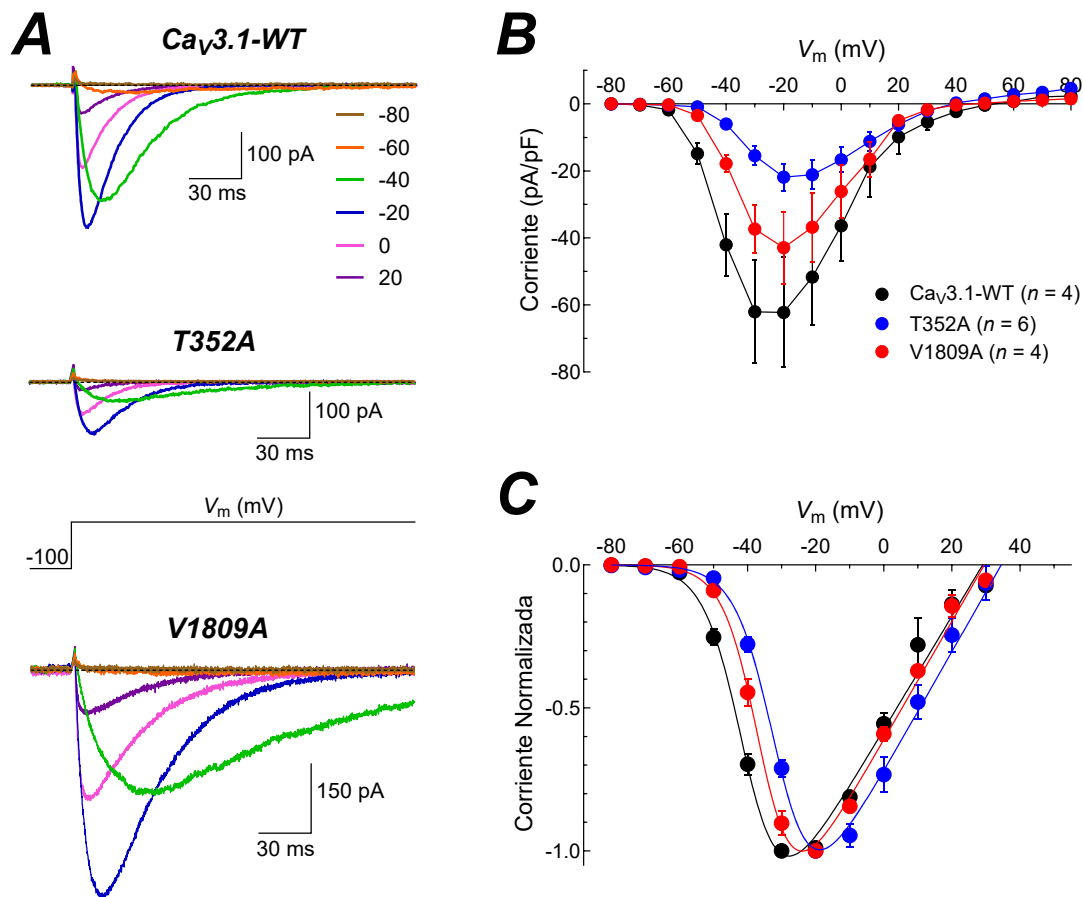


Figura 15. Dependencia al voltaje de la activación de los canales $Ca_v3.1$ -WT y mutantes. **A) Ejemplos representativos de las amplitudes de las corrientes de calcio generadas por los canales $Ca_v3.1$ -WT y las mutantes T352A y V1809A. **B)** Curvas I - V de la densidad de corriente promedio \pm EE para los canales indicados. La mutante T352A expresó las corrientes de menor amplitud, mientras que los de la mutante V1809A son parecidas en amplitud a las del canal silvestre. **C)** Curvas I - V normalizadas para las mismas células del panel (B). Las líneas continuas son ajustes de los datos experimentales con la Ecuación 1, cuyos parámetros se presentan en la Tabla 2. La mutante T352A indujo un desplazamiento significativo de la curva I - V (~ 10 mV) hacia valores de voltajes más positivos, respecto al control.**

La corriente registrada a cada voltaje depende de la diferencia entre el voltaje de membrana (V_m) y el potencial de inversión, es decir, el voltaje al cual la corriente se hace cero e invierte su dirección. Modificaciones en el potencial de inversión se relacionan con cambios en la selectividad de los canales de calcio por el ion Ca^{+2} sobre otros cationes monovalentes. Como se puede ver en los valores de la Tabla 2, las mutantes del canal $Ca_v3.1$ no produjeron cambios significativos en el valor de voltaje al cual invierte la

corriente de entrante a saliente (V_{rev}), lo que indica que dichas mutaciones no alteran el funcionamiento del filtro de selectividad del canal $Ca_v3.1$. De igual manera, el valor de la pendiente k de las curvas $I-V$ no presentó cambios en las mutaciones evaluadas con respecto al control (**Tabla 2**), lo que se traduce en un comportamiento constante de la tasa de canales activados por unidad de voltaje. En suma, la dependencia al voltaje de activación de los canales T352A, y en menor medida, los de V1809A se desplazó a voltajes más positivos respecto a la del canal silvestre.

Tabla 2. Parámetros de la activación e inactivación dependiente de voltaje de los canales $Ca_v3.1$

Canal	Activación					Inactivación		
	pA/pF	$V_{1/2}$ (mV)	k (mV)	V_{rev} (mV)	n	$V_{1/2}$ (mV)	k (mV)	n
$Ca_v3.1$ -WT	-62 ± 16	-41.3 ± 1.0	5.2 ± 0.1	33.8 ± 1.8	4	-75.8 ± 1.1	5.3 ± 0.1	5
T352A	-22 ± 4	$-30.7 \pm 1.0^*$	5.7 ± 0.3	34.7 ± 2.7	6	-73.7 ± 1.1	5.8 ± 0.3	6
V1809A	-43 ± 11	-36.6 ± 1.2	4.7 ± 0.2	34.2 ± 0.8	4	$-72.8 \pm 0.6^*$	5.1 ± 0.2	5

Valores (promedio \pm error estándar) de los parámetros biofísicos para el canal $Ca_v3.1$ silvestre y las mutantes indicadas. La densidad de corriente (pA/pF), es el valor máximo obtenido de las curvas $I-V$, que en las 3 mutantes fue a -20 mV. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran con * $p < 0.01$.

5.4.2. Inactivación en el estado estacionario

La inactivación en el estado estacionario es una propiedad que describe la transición de los canales del estado cerrado al inactivado, y es una medida de la proporción de canales que están disponibles para ser activados a diferentes valores de V_m . Esta propiedad biofísica de los canales $Ca_v3.1$ se exploró mediante el empleo del protocolo de voltaje *Hinf10s-100*, el cual consiste en dos pulsos, uno (prepulso) de larga duración a varios valores de V_m , seguido de un segundo pulso (breve) de prueba siempre a -30 mV. La amplitud de las corrientes registradas durante el pulso de prueba fue normalizada con respecto al valor de la corriente máxima y los datos se graficaron en función del voltaje del prepulso correspondiente (**Fig. 16**). Los parámetros obtenidos de dichos ajustes se presentan también en la **Tabla 2**. Tanto la mutante V1809A como la T352A, mostraron un ligero desplazamiento a la derecha (línea azul y rojo, respectivamente) de la fracción de canales inactivados a cualquier voltaje, en relación con la del canal $Ca_v3.1$ silvestre. El

voltaje al cual se encuentra inactivados el 50% de los canales cambio de -75 a -73 y -72 mV, respectivamente. No obstante que las diferencias con la mutante V1809A fueron significativas ($p < 0.01$; **Tabla 2**), la relevancia fisiológica de un cambio de 3 mV en la fracción de canales disponibles para ser activados a voltajes más negativos que -60 mV podría no tener consecuencias en la excitabilidad celular. De mayor relevancia para el presente trabajo, resultó el hecho de que la proporción de canales inactivados a -100 mV es prácticamente la misma en los canales mutantes y el canal silvestre (**Fig. 16**), lo cual sugiere que las variaciones en la potencia del bloqueo del mibefradil no son debidas a un aumento en la fracción de canales inactivados en el estado estacionario a -100 m (el cual fue el valor de potencial de mantenimiento empleado en los experimentos para evaluar el efecto inhibitorio del Mibefradil).

5.4.3. Cinética de las corrientes

La evaluación de la cinética con la que la población de canales transita a diferentes estados conformacionales en respuesta a cambios en el V_m se llevó a cabo por medio de dos protocolos de voltaje. Primero, se realizaron ajustes de funciones exponenciales, para la activación e inactivación, de cada uno de los trazos de corriente generados en respuesta al protocolo *IV-100*, con lo que se obtuvieron las respectivas constantes de tiempo (taus): τ_{act} y τ_{inact} , mismas que fueron promediadas entre grupos de canales y los resultados se graficaron en función del voltaje (**Fig. 17A y B**). Únicamente se muestran los valores de las taus en el intervalo de -50 a +20 mV, debido a que a potenciales más negativos, la amplitud de las corrientes es prácticamente cero y no se pueden ajustar exponenciales a dichos registros de corriente. En todos los casos las mutaciones promovieron una ralentización de la cinética del canal silvestre. Respecto a la cinética de activación los cambios significativos se observaron solo a -20 y -10 mV entre las mutantes y el canal Cav3.1 silvestre (**Fig. 17A**). Sin embargo, la mutante V1809A presentó un curso temporal de inactivación más lento (~ 160%) que el canal silvestre, que se manifestó a todos los voltajes mostrados en la **Fig. 17B**; mientras que la mutante T352 se inactivo de manera similar que el canal Cav3.1-WT.

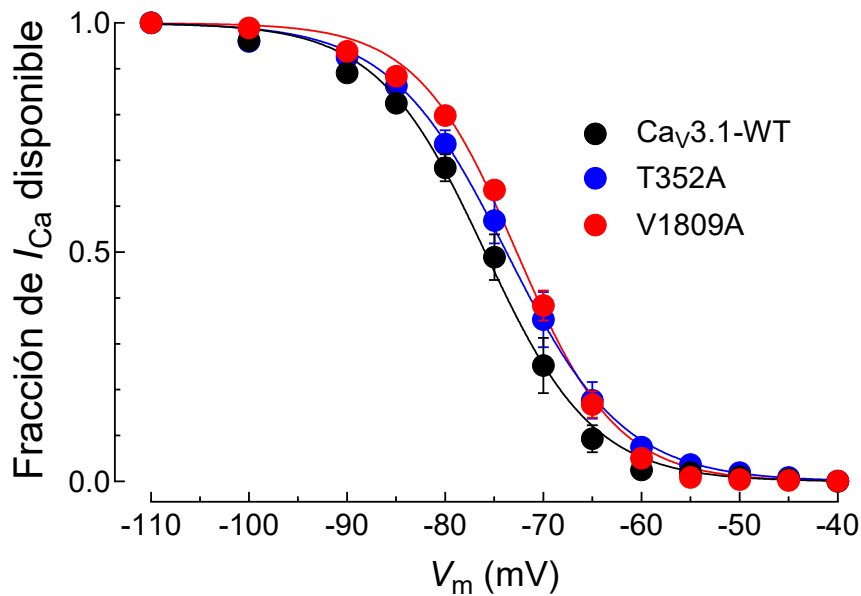


Figura 16. Inactivación en el estado estacionario de los canales Ca_v3.1. Fracción de canales inactivados en función del voltaje del prepulso de 10 s de duración para los tres canales indicados. Las líneas continuas son el ajuste de los datos experimentales con una función Boltzmann (Ecuación 2), cuyos parámetros se presentan en la **Tabla 2**. Nótese que la fracción de canales disponibles para ser activados a -100 mV es prácticamente la misma para el canal silvestre y los dos mutantes.

En segundo lugar, se midió el tiempo promedio que le toma a los canales transitar del estado abierto al estado cerrado mediante el protocolo de colas de corriente como el que se ilustra en la **Fig. 17C**. El cierre de los canales se estudió a voltajes entre -150 y -80 mV, después de una breve despolarización de 2 ms para abrir los canales a +60 mV. Las colas de corriente generadas por el cierre de los canales al repolarizar la membrana se ajustaron con una función exponencial y de esta manera se obtuvo la constante de tiempo de desactivación de los canales (τ_{desact}). Los valores promedio de dichas constantes para cada canal se presentan en la **Fig. 17D**. La constante de tiempo de desactivación (τ_{desact}), es una medida del tiempo promedio que le toma a los canales pasar del estado abierto al estado cerrado. Interesantemente, este parámetro fue modificado drásticamente por la mutación de Val por Ala en la posición 1809 de la proteína del canal Ca_v3.1. En promedio el canal mutante se cerró 1.65 veces ó 165% más lento que el canal silvestre, en el rango

de voltajes entre -150 y -100 mV. A voltajes más positivos (-90 y -80 mV) los canales mutantes V1809A se cerraron aún más lentamente (200 y 216%, respectivamente), debido a que a dichos voltajes una fracción de los canales se inactivan (**Fig. 12**) y por lo tanto las colas de corriente reflejan no solo el cierre de los canales sino también el proceso de inactivación de estos.

Otro parámetro importante para considerar cuando se analizan mutaciones puntuales en la proteína de canales activados por voltaje es el tiempo de recuperación del estado inactivado, es decir el tiempo mínimo necesario para que los canales inactivados, se encuentren nuevamente disponibles para ser activados y conducir corriente. Para evaluar esta recuperación de la inactivación, se utilizó un protocolo de voltaje denominado *Recover-100* (ver Metodología) que consiste en dos pulsos despolarizantes a un mismo voltaje (-20 mV, en este caso) separados por periodos de tiempo crecientes desde 1 hasta 2000 ms (**Fig. 18A**, esquema de protocolo de voltaje). El primer pulso despolarizante es de larga duración (200 ms) con la finalidad de que todos los canales activados a -20 mV circulen al estado inactivado. El segundo pulso a -20 mV perdura solo 30 ms pues solo interesa visualizar el pico de la corriente recuperada. Como se puede observar en los trazos de corriente representativos del canal Cav3.1-WT y de la mutante V1809A (**Fig. 18A**), la amplitud de la corriente al pico durante el segundo pulso a -20 mV aumenta progresivamente conforme transcurre más tiempo después del final del pulso inactivante a -20 mV. En el canal silvestre la corriente del segundo pulso iguala en amplitud la del pulso inactivante después de transcurridos 1.2 s (trazos negros), mientras que la mutante V1809A lo hace hasta los 2 s (trazos rojos). En cada uno de los registros de corriente obtenidos en respuesta a los pulsos breves a -20 mV se genera una cola de corriente al repolarizar la membrana a -100 mV, cuya amplitud excede la escala de los gráficos mostrados por lo que se muestran cortadas. En este protocolo no se utiliza ninguna información de las colas de corriente.

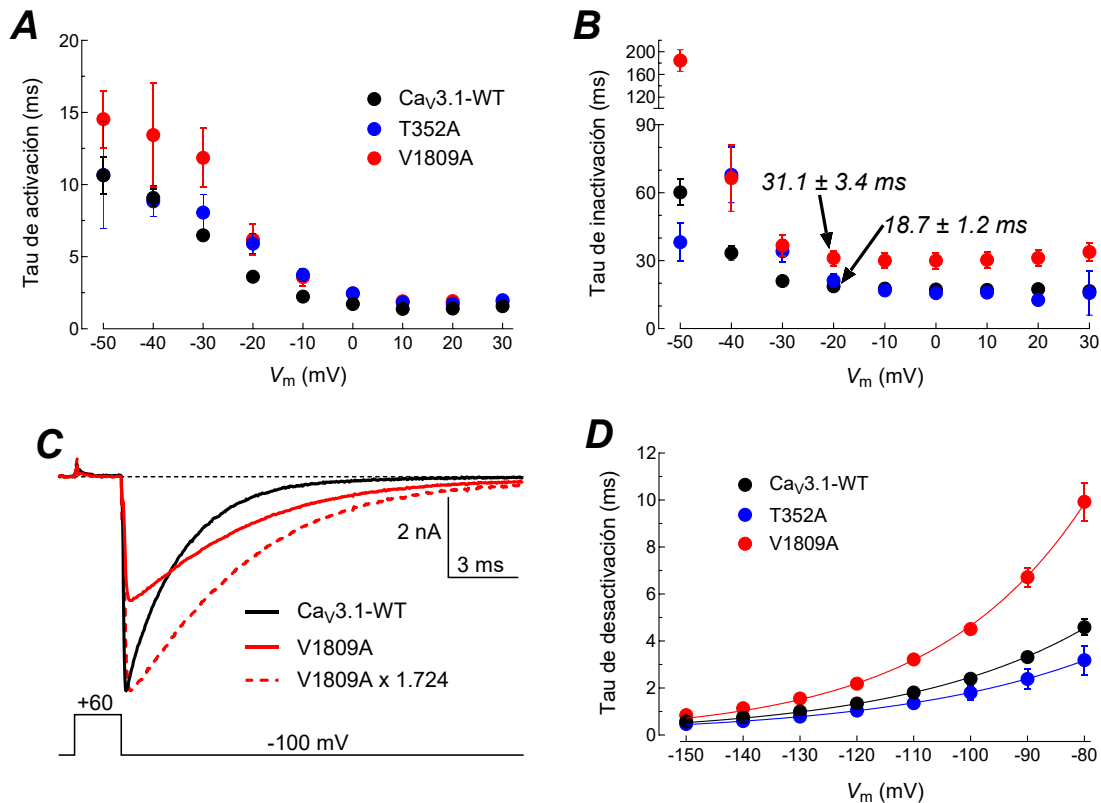


Figura 17. Curso temporal de la activación, inactivación y desactivación de las corrientes de los canales Cav3.1. Constantes de tiempo de activación (**A**) e inactivación (**B**), para las mutantes indicadas en presencia de 5 mM de Ca²⁺. Cada punto experimental es el promedio \pm el error estándar de cada grupo de canales a los voltajes indicados. La inactivación de la mutante V1809A fue aproximadamente 1.5 veces más lenta que la del canal silvestre. Como ejemplo, en el gráfico se indican los valores a -20 mV. **C**) Colas de corriente a -100 mV representativas de los canales Cav3.1-WT y la mutante V1809A. Las corrientes de Ca²⁺ fueron evocadas con el protocolo que se ilustra al pie del panel. La línea roja punteada es la cola de corriente de la mutante V1809A normalizada con la amplitud de la del canal silvestre para fines de comparación de la cinética del cierre de los canales a -100 mV. **D**) Constantes de tiempo (promedio \pm EE) de las colas de corriente en función del V_m de repolarización para los canales indicados. Los valores de las taus de desactivación respectivas se presentan en la **Tabla 3**. Las líneas continuas corresponden al ajuste de los datos experimentales con una función exponencial que muestra el comportamiento dependiente de voltaje del cierre de los tres diferentes canales.

Los datos experimentales mostrados en la **Fig. 18B** se obtuvieron normalizando la amplitud de la corriente registrada en respuesta al segundo pulso despolarizante respecto a la amplitud del primero, después estos valores se promediaron y se graficaron en función del tiempo que separa a los dos pulsos a -20 mV. Lo anterior se realizó para cada uno de los tres diferentes canales estudiados. Las líneas continuas representan el ajuste con

funciones exponenciales de los datos de cada canal. Las constantes de tiempo de recuperación utilizadas para comparar entre los diferentes canales se obtuvieron promediando las constantes respectivas obtenidas del ajuste individual de los datos obtenidos de cada célula para cada canal. Como se ilustra en la **Fig. 18B**, la mutante V1809A mostró diferencias significativas respecto al canal silvestre, pues el curso temporal de la recuperación fue 3 veces más lento respecto al canal Cav3.1-WT ($p < 0.01$). La mutante T352A también se recuperó más lentamente de la inactivación, aunque en este caso la significancia estadística fue de solo $p = 0.0248$.

Tabla 3. Parámetros cinéticos de las corrientes de Ca²⁺ de los canales Cav3.1.

Canal	n	τ_{act} (ms)	τ_{inact} (ms)	n	τ_{desact} (ms)
<i>Cav3.1-WT</i>	4	3.6 ± 0.2	18.7 ± 1.2	4	2.5 ± 0.2
<i>T352A</i>	6	5.9 ± 0.7*	21.2 ± 3.0	5	1.8 ± 0.3
<i>V1809A</i>	5	6.2 ± 1.0*	31.1 ± 3.4*	4	4.5 ± 0.2*

Los valores son el promedio ± el error estándar, con el número de células indicadas en las columnas *n*. Las constantes de tiempo de (τ) de activación e inactivación se obtuvieron a partir del ajuste con dos exponenciales de los registros de corriente a -20 mV (protocolo IV-100). La constante de desactivación se obtuvo de los ajustes individuales con una función exponencial de las colas de corriente registradas a -100 mV. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran con un asterisco: $p < 0.01$.

En resumen, las diferencias en las propiedades biofísicas entre el canal Cav3.1-WT y las mutantes, principalmente en la inactivación en estado estacionario, no implican un efecto que pudiera interferir en el bloqueo del mibefradil, por lo que cualquier efecto observado en estas mutantes se considerará como debido a alteraciones en el acoplamiento del mibefradil a su sitio de unión.

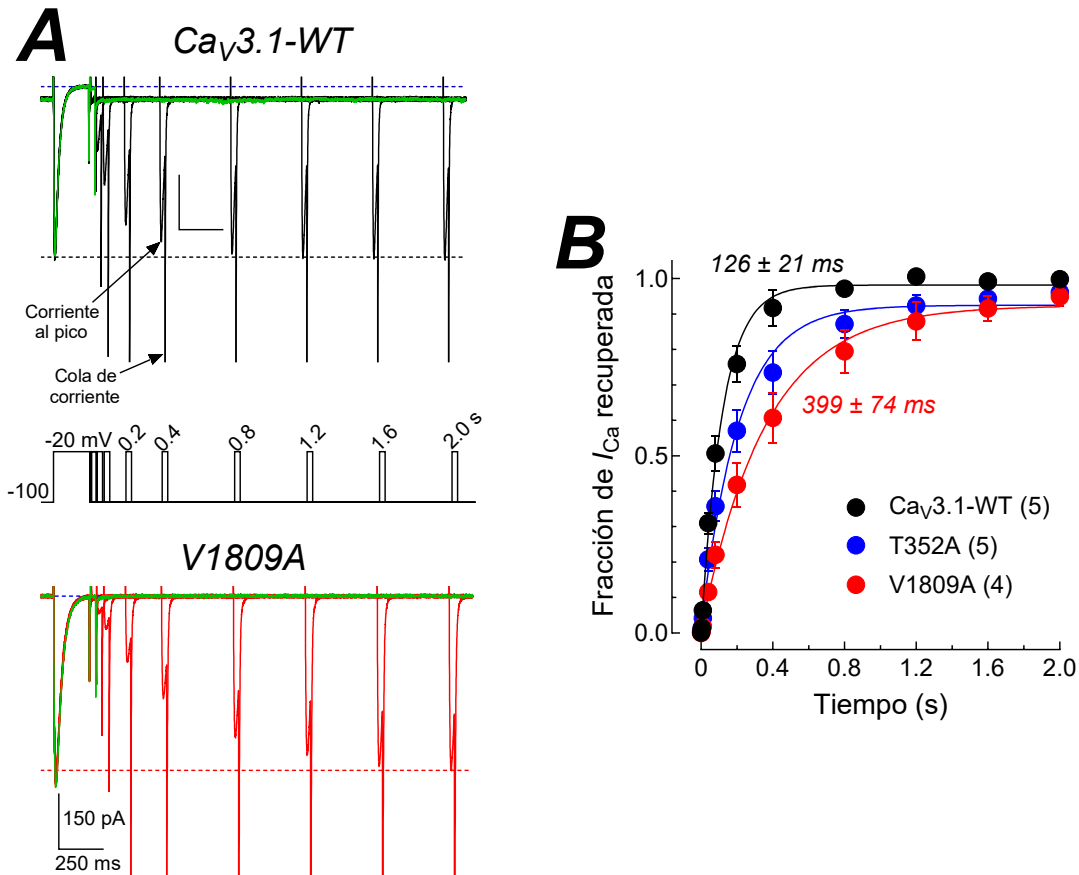


Figura 18. Recuperación de la inactivación de los canales $Ca_v3.1$. **A)** Trazos representativos de la recuperación de la inactivación del canal $Ca_v3.1$ -WT (trazos superiores) y de la mutante V1809A (trazos inferiores) en respuesta al protocolo ilustrado entre ambos grupos de trazos. El trazo en verde ilustra las corrientes registradas cuando ambos pulsos despolarizantes a -20 mV están separados por 5 ms para ilustrar la corriente diminuta que se activa después de solo 5 ms de recuperación de la inactivación. Las líneas horizontales punteadas indican el valor de la amplitud máxima de corriente durante el pulso a -20 mV recuperada después de 2 s para cada canal. Las colas de corriente generadas al repolarizar los pulsos al HP de -100 se muestran recortadas para fines de mejor apreciación de la corriente al pico durante el pulso a -20 mV. En la parte de en medio se muestra el protocolo de voltaje empleado (*recovery-100*) para generar las corrientes ilustradas en ambos paneles. **B)** Fracción de corriente recuperada de cada uno de los canales indicados a diferentes intervalos de tiempo, después de inducir la inactivación de los canales con una despolarización a -20 mV. Los datos son el promedio \pm EE, con el número de células investigadas mostradas entre paréntesis. Las líneas continuas son el ajuste de los datos experimentales con funciones exponenciales. Se indica la constante de tiempo de recuperación de la inactivación (τ_h) para el canal $Ca_v3.1$ -WT y la mutante V1809A, misma que fue 3 veces más lenta que la primera.

5.5. Determinación del modo de unión del mibefradil en el canal Cav3.1

Para determinar el posible modo de unión del mibefradil en el Cav3.1, se definieron espacios de búsqueda de 30 x 30 x 30 Å en las proximidades del aminoácido V1809 como se muestra en la **Fig. 14**. Se utilizó el mismo algoritmo descrito en la sección 3.1 para los primeros ensayos de *docking*, permitiendo a los aminoácidos adoptar distintas conformaciones y realizando mutaciones *in silico* durante las simulaciones de *docking*. Finalmente, para determinar el modo de unión más probable, únicamente se seleccionaron los modos de unión que presentaron una energía de interacción menor a -80 kcal/mol. Mediante el software de modelado molecular Schrödinger/Maestro23 se pudo confeccionar un mapa 2D de la interacción del mibefradil con el Cav3.1.

Se realizaron ensayos de acoplamiento molecular y mutaciones *in silico*, de la misma manera se permitieron rotaciones de los aminoácidos que participan en la unión del mibefradil. Se realizaron aproximadamente 20 repeticiones de ensayos de acoplamiento con las condiciones mencionadas, y se seleccionó el modo de unión con mayor repetibilidad. Sin embargo, cabe mencionar que la determinación precisa de la unión de un ligando a su receptor es un trabajo complejo, el presente proyecto no es capaz de la determinación exacta de esta interacción, sin embargo, se puede generar la pose de unión más probable basados en los resultados experimentales.

Dicho esto, se determinó que el mibefradil se posiciona en la cavidad central, formando enlaces con varios aminoácidos de los S6 de cada Dominio, como se observa en la **Fig. 19**. Por su parte, la **Fig. 20** muestra las interacciones formadas entre el mibefradil y el Cav3.1 dado el modo de unión seleccionado. Como se puede observar el grupo bencimidazol forma interacciones polares con los aminoácidos circundantes T1766, así como S1775 con la cual se encuentra formando un puente de hidrogeno muy cerca del filtro de selectividad (**Fig. 20A y C**). Por otro lado, cabe mencionar que pese a que la Q1805 se encuentra suficientemente cerca para interactuar con el mibefradil, este sitio fue señalado como el principal responsable de la interacción del bloqueador de calcio TTA-A2 al mibefradil, derivado del trabajo de tesis del Biólogo Eduardo Chávez Colorado con el Cav3.1, donde se demuestra experimentalmente que mutaciones del sitio Q1805 por prolina o alanina no afectan el acoplamiento del mibefradil, sin embargo el bloqueo se ve

afectado cuando se realiza un cambio por arginina (69), sugeriendo de que la Q1805 se encuentra suficientemente cerca o en la ruta de acceso del mibefradil, validando los resultados obtenidos *in silico* del presente trabajo. Asimismo, los grupos flunafaleno e isopropil se dirigen hacia el dominio II y III interactuando con L959, F956, L1506 y F1509 mediante contactos hidrofóbicos, así como con la L391 y V1814 del dominio I y IV, respectivamente. Además, el grupo metoxiacetado forma un puente de hidrogeno con la N388 e interactuando con la F384 a través de enlaces polares.

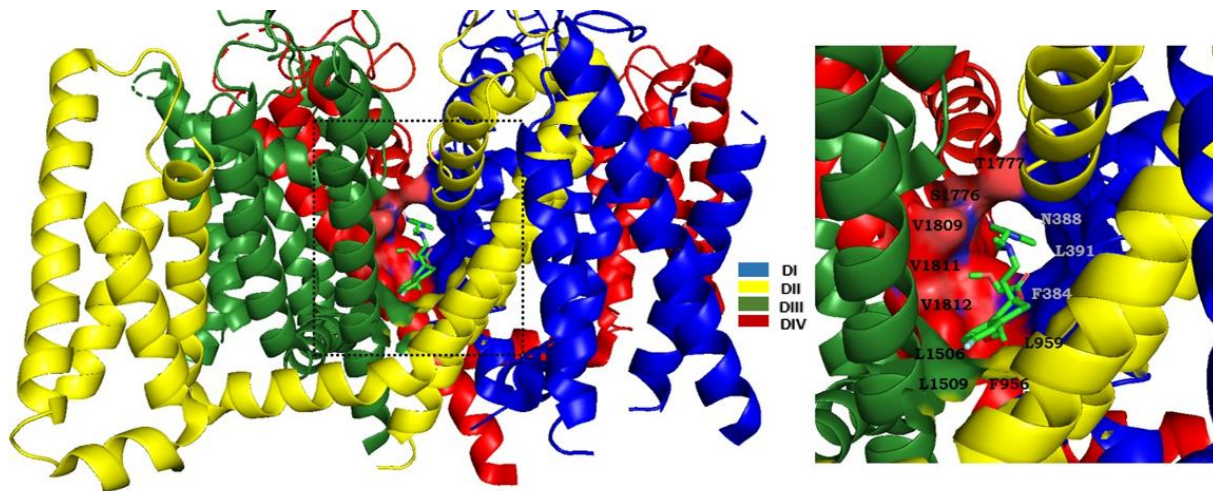


Figura 19. Acoplamiento molecular del mibefradil en la subunidad α_1 del canal tipo T Cav3.1. A la izquierda se muestra el acoplamiento del mibefradil en la cavidad central formada por la interfase de los 4 Dominios que forman la subunidad α_1 . Se resalta la superficie molecular de los aminoácidos que se acoplan energéticamente *in silico* en el modo de unión ilustrado. A la derecha, se muestra aumentado en tamaño el cubo negro de la izquierda para mayor detalle de los aminoácidos que interactúan con el mibefradil, incluyendo la V1809 que se estudió en el presente trabajo.

Por otro lado, el grupo propil metilamino se encuentra interactuando hidrofobicamente con la L1808, sin embargo, resultados experimentales adicionales de nuestro grupo de investigación muestran que este aminoácido no forma parte del sitio de unión del mibefradil. Además, el modelo también indica una posible interacción con la V1809 con el grupo propil metilamino (**Fig. 20A y C**), la cual ya se demostró con los resultados obtenidos con las mutaciones V1809A y V1809G en el presente trabajo de tesis. Recientemente se publicó la estructura del canal Cav3.3 en presencia del antagonista mibefradil y dentro de los residuos con los que establece interacciones en dicho canal se encuentra la Ile1687 (76), la cual es equivalente a la V1809 del canal Cav3.1 que se estudia en el presente

trabajo de tesis. Por lo anterior, a reserva de investigar la participación de otros aminoácidos sugeridos tanto por nuestras simulaciones de *docking* como por la estructura de Crio microscopia (76), los resultados del presente trabajo demuestran que la V1809 forma parte del sitio de unión del mibefradil en el canal Cav3.1.

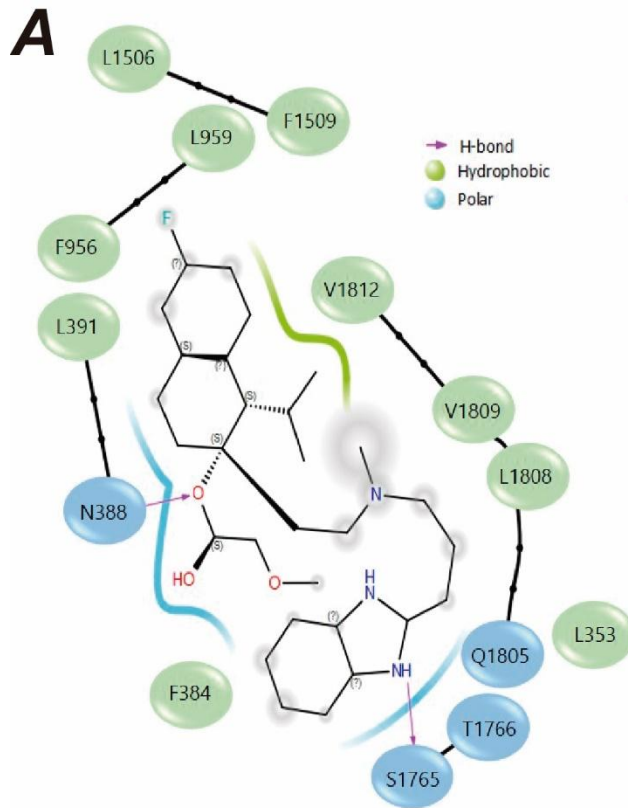
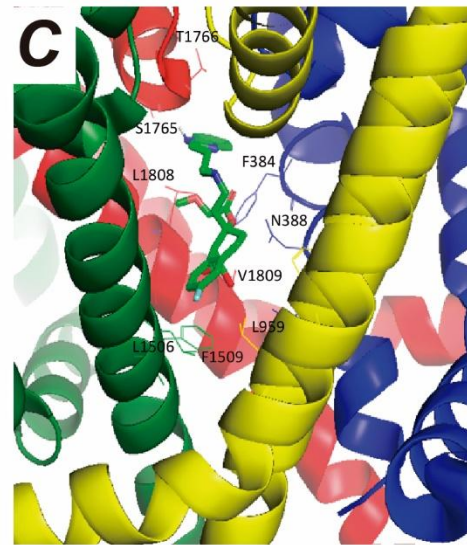
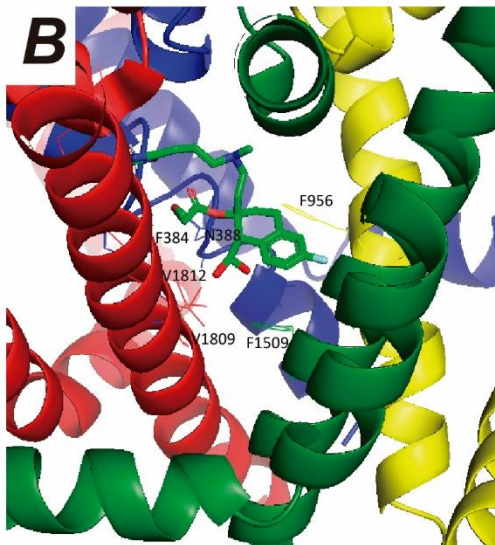


Figura 20. Modo de unión del mibefradil en el canal Cav3.1. A) Mapa 2D de la interacción del mibefradil con la proteína del canal Cav3.1. La Asp388 del S6 del Dominio I se encuentra formando un puente de hidrogeno con el grupo acetato de metilo; así como la Ser1776 del IVS6 con el grupo benzamidazol. Por su parte, la Val1809 se encuentra formando interacciones hidrófobas con el grupo isopropil metiamino. Abajo se muestra la Vista lateral de la interacción del mibefradil con los dominios III y IV (B) y II y III (C).



Es importante mencionar que según los resultados de la presente tesis, el sitio de unión del mibefradil se encuentra cerca del filtro de selectividad y de la compuerta intracelular del canal Cav3.1 (**Fig. 20**). De hecho, la V1809 se ubica a 3 residuos de la V1812, uno de los cuatro aminoácidos que forman la compuerta intracelular (31), la cual presentó disminución en el porcentaje de bloqueo (**Fig. 13C**), y posiblemente esta disminución sea debida a la alteración del funcionamiento de la compuerta de activación y no a una alteración en la interacción ligando-proteína. Por el contrario, la disminución en el porcentaje de bloqueo observada con las mutaciones de la V1809 puede ser atribuido a una alteración de la interacción ligando-proteína y no a una interferencia con el mecanismo de activación del canal como se demostró en la sección 4.4.1 (Dependencia al voltaje de la activación).

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis permitieron evidenciar experimentalmente un aminoácido que forma parte del sitio de unión del mibefradil al canal de calcio Cav3.1, asimismo, se describió el modo de interacción adoptado más probable del mibefradil.

- Se comprueba experimentalmente que la V1809 es parte del sitio de unión del mibefradil en el canal Cav3.1.
- La V1809 no se relaciona con algún mecanismo que tenga que ver con la activación del canal, pese a que las evidencias experimentales e *in silico* apuntan a que el sitio de unión se encuentra muy cerca de la compuerta intracelular.
- El sitio de unión del mibefradil se encuentra en la cavidad central del Cav3.1, muy cerca de la compuerta intracelular, donde establece interacciones con varios aminoácidos además de la V1809, como la N388 y la S1765, principalmente.

7. REFERENCIAS

1. Lipscombe, D., & Toro, C. P. (2021). Ion channels. En *Encyclopedia of Life Sciences* (pp.1–21). Wiley.
2. Rasband, M. N. (2010). Canales iónicos y células excitables. *Nature Education*, 3(9):41.
3. Di Resta, C., & Becchetti, A. (2010). Introduction to ion channels. *Advances in experimental medicine and biology*, 674, 9–21.
4. Hille B. (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes*. 3ra ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
5. HODGKIN, A. L., & HUXLEY, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of Physiology*, 117(4), 500–544.
6. Catterall, W. A., Raman, I. M., Robinson, H. P. C., Sejnowski, T. J., & Paulsen, O. (2012). The Hodgkin-Huxley heritage: From channels to circuits. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(41), 14064–14073.
7. Simms, B. A., & Zamponi, G. W. (2014). Neuronal voltage-gated calcium channels: Structure, function, and dysfunction. *Neuron*, 82(1), 24–45.
8. Clapham, D. E. (2007). Calcium signaling. *Cell*, 131(6), 1047–1058.
9. Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 1(1), 11–21.
10. Yang, S., & Berggren, P. (2006). The Role of Voltage-Gated Calcium Channels in Pancreatic β -Cell Physiology and Pathophysiology. *Endocrine Reviews*, 27(6), 621–676.
11. Bers D. M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 415(6868), 198–205.
12. Dolphin, A. C. (2006). A short history of voltage-gated calcium channels: Voltage-gated calcium channels. *British Journal of Pharmacology*, 147 Suppl 1(S1), S56-62.
13. Felix, R., Calderón-Rivera, A., & Andrade, A. (2013). Regulation of high-voltage-activated Ca^{2+} channel function, trafficking, and membrane stability by auxiliary subunits. *Wiley interdisciplinary reviews. Membrane Transport and Signaling*, 2(5), 207–220.
14. Lacinová, L., Klugbauer, N., & Hofmann, F. (2000). Low voltage activated calcium channels: from genes to function. *General Physiology and Biophysics*, 19(2), 121–136.
15. García, J., & Beam, K. G. (1994). Calcium transients associated with the T type calcium current in myotubes. *The Journal of General Physiology*, 104(6), 1113–1128.
16. Ono, K., & Iijima, T. (2010). Cardiac T-type Ca^{2+} channels in the heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48(1), 65–70.
17. Catterall, W. A. (2011). Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3(8), a003947.
18. Bourinet, E., & Zamponi, G. W. (2017). Block of voltage-gated calcium channels by peptide toxins. *Neuropharmacology*, 127, 109–115.
19. Wormuth, C., Lundt, A., Henseler, C., Müller, R., Broich, K., Papazoglou, A., & Weiergräber, M. (2016). Review: $\text{Ca}_v2.3$ R-type Voltage-Gated Ca^{2+} Channels - Functional Implications in Convulsive and Non-convulsive Seizure Activity. *The Open Neurology Journal*, 10, 99–126.
20. Nimmrich, V., & Gross, G. (2012). P/Q-type calcium channel modulators: P/Q-type calcium channel blockers. *British Journal of Pharmacology*, 167(4), 741–759.
21. Catterall, W. A., Perez-Reyes, E., Snutch, T. P., & Striessnig, J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 411–425.
22. Striessnig, J., Hoda, J.C., Wappl, E., Koschak, A. (2005). The Molecular Basis of Ca^{2+} Antagonist Drug Action-Recent Developments. In: *Voltage-Gated Calcium Channels*. Molecular Biology Intelligence Unit. Springer, Boston, MA.

23. Gurkoff, G., Shahlaie, K., Lyeth, B., & Berman, R. (2013). Voltage-gated calcium channel antagonists and traumatic brain injury. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 6(7), 788–812.
24. Talley, E. M., Cribbs, L. L., Lee, J. H., Daud, A., Perez-Reyes, E., & Bayliss, D. A. (1999). Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *J Neurosci*, 19(6), 1895–1911.
25. Perez-Reyes, Edward. (2003). Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiological Reviews*, 83(1), 117–161.
26. Cain, S. M., & Snutch, T. P. (2010). Contributions of T-type calcium channel isoforms to neuronal firing. *Channels (Austin, Tex.)*, 4(6), 475–482.
27. Arteaga-Tlecuitl, R., Sanchez-Sandoval, A. L., Ramirez-Cordero, B. E., Rosendo-Pineda, M. J., Vaca, L., & Gomora, J. C. (2018). Increase of Ca_v3 channel activity induced by HVA $\beta 1b$ -subunit is not mediated by a physical interaction. *BMC Research Notes*, 11(1).
28. Dolphin A. C. (2016). Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology. *The Journal of Physiology*, 594(19), 5369–5390.
29. Neely, A., & Hidalgo, P. (2014). Structure-function of proteins interacting with the $\alpha 1$ pore-forming subunit of high-voltage-activated calcium channels. *Frontiers in Physiology*, 5, 209.
30. Snutch TP, Peloquin J, Mathews E, McRory JE. Molecular Properties of Voltage-Gated Calcium Channels. In: *Madame Curie Bioscience Database [Internet]*. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6181/>.
31. Yao, X., Gao, S., & Yan, N. (2024). Structural biology of voltage-gated calcium channels. *Channels (Austin)*, 18(1), 2290807.
32. Gao, Y., Xu, S., Cui, X., Xu, H., Qiu, Y., Wei, Y., Dong, Y., Zhu, B., Peng, C., Liu, S., Zhang, X. C., Sun, J., Huang, Z., & Zhao, Y. (2023). Molecular insights into the gating mechanisms of voltage-gated calcium channel $Ca_v2.3$. *Nature Communications*, 14(1), 516.
33. Börjesson, S. I., & Elinder, F. (2008). Structure, function, and modification of the voltage sensor in voltage-gated ion channels. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 52(3), 149–174.
34. Yang, J. (2016). Calcium channel structures come of age. *Cell Research*, 26 (12), 1271–1272.
35. Ma, Z., Lou, X. J., & Horrigan, F. T. (2006). Role of charged residues in the S1-S4 voltage sensor of BK channels. *The Journal of General Physiology*, 127(3), 309–328.
36. Catterall, William A. (2010). Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology. *Neuron*, 67(6), 915–928.
37. Campiglio, M., & Flucher, B. E. (2015). The role of auxiliary subunits for the functional diversity of voltage-gated calcium channels. *Journal of Cellular Physiology*, 230(9), 2019–2031.
38. Dolphin, A. C. (2018). Voltage-gated calcium channels: their discovery, function and importance as drug targets. *Brain and Neuroscience Advances*, 2, 239821281879480.
39. Buraei, Z., & Yang, J. (2010). The β Subunit of Voltage-Gated Ca^{2+} Channels. *Physiological Reviews*, 90(4), 1461–1506.
40. Randall, A., & Benham, C. D. (1999). Recent advances in the molecular understanding of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 14(4-5), 255–272.
41. Wu, J., Yan, Z., Li, Z., Yan, C., Lu, S., Dong, M., & Yan, N. (2015). Structure of the voltage-gated calcium channel $Ca_v1.1$ complex. *Science*, 350(6267).
42. Melgari, D., Frosio, A., Calamaio, S., Marzi, G. A., Pappone, C., & Rivolta, I. (2022). T-Type calcium channels: a mixed blessing. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17).
43. Huguenard JR. (1996). Corrientes de calcio de bajo umbral en neuronas del sistema nervioso central. *Annu. Rev. Physiol*, 58, 329–348.
44. Weiss, N., & Zamponi, G. W. (2024). The T-type calcium channelosome. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 476(2), 163–177.

45. Wang, D., Ragnarsson, L., & Lewis, R. J. (2020). T-type Calcium Channels in Health and Disease. *Current Medicinal Chemistry*, 27(19), 3098–3122.
46. Vickstrom, C. R., Liu, X., Zhang, Y., Mu, L., Kelly, T. J., Yan, X., Hu, M. M., Snarrenberg, S. T., & Liu, Q. S. (2020). T-Type Calcium Channels Contribute to Burst Firing in a Subpopulation of Medial Habenula Neurons. *eNeuro*, 7(4), ENEURO.0201-20.2020.
47. Zhan, X. J., Cox, C. L., Rinzel, J., & Sherman, S. M. (1999). Current clamp and modeling studies of low-threshold calcium spikes in cells of the cat's lateral geniculate nucleus. *Journal of Neurophysiology*, 81(5), 2360–2373.
48. De Ridder, D., Vanneste, S., Langguth, B., & Llinas, R. (2015). Thalamocortical dysrhythmia: A theoretical update in tinnitus. *Frontiers in Neurology*, 6, 124.
49. Kopecky, B. J., Liang, R., & Bao, J. (2014). T-type calcium channel blockers as neuroprotective agents. *Pflugers Archiv. European Journal of Physiology*, 466(4), 757–765.
50. Weiss, N., & Zamponi, G. W. (2019). T-type calcium channels: From molecule to therapeutic opportunities. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 108, 34–39.
51. Huc, S., Monteil, A., Bidaud, I., Barbara, G., Chemin, J., & Lory, P. (2009). Regulation of T-type calcium channels: signalling pathways and functional implications. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793(6), 947–952.
52. Powell, K. L., Cain, S. M., Snutch, T. P., & O'Brien, T. J. (2014). Low threshold T-type calcium channels as targets for novel epilepsy treatments: T-channels and epilepsy treatments. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 77(5), 729–739.
53. Barker, B. S., Young, G. T., Soubrane, C. H., Stephens, G. J., Stevens, E. B., & Patel, M. K. (2017). Ion Channels. In *Conn's Translational Neuroscience* (eds Conn, P. M.) Ch. 2, 11–43. Academic Press.
54. Hering, S., Sokolov, S., Berjukow, S., Marksteiner, R., Margreiter, E., & Timin, E. N. (2013). Calcium Channel Block and Inactivation: Insights from Structure-Activity Studies. *Madame Curie Bioscience Database - NCBI Bookshelf*.
55. Gomora: Lee JH, Gomora JC, Cribbs LL, Perez-Reyes E. (1999). Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block alpha1H. *Biophys J*. 77(6):3034-42.
56. Chuang, R. S., Jaffe, H., Cribbs, L., Perez-Reyes, E., & Swartz, K. J. (1998). Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. *Nature Neuroscience*, 1(8), 668–674.
57. Billups, S. J., & Carter, B. L. (1998). Mibefradil: a new class of calcium-channel antagonists. *The Annals of Pharmacotherapy*, 32(6), 659–671.
58. Ernst, M. E., & Kelly, M. W. (1998). Mibefradil, a pharmacologically distinct calcium antagonist. *Pharmacotherapy*, 18(3), 463–485.
59. Mullins, M. E., Horowitz, B. Z., Linden, D. H., Smith, G. W., Norton, R. L., & Stump, J. (1998). Life-threatening interaction of mibefradil and beta-blockers with dihydropyridine calcium channel blockers. *JAMA*, 280(2), 157–158.
60. Welker, H. A., Wiltshire, H., & Bullingham, R. (1998). Clinical pharmacokinetics of mibefradil. *Clinical Pharmacokinetics*, 35(6), 405–423.
61. Wandel, C., Kim, R. B., Guengerich, F. P., & Wood, A. J. (2000). Mibefradil is a P-glycoprotein substrate and a potent inhibitor of both P-glycoprotein and CYP3A in vitro. *Drug metabolism and disposition*, 28(8), 895–898.
62. Bui, P. H., Quesada, A., Handforth, A., & Hankinson, O. (2008). The mibefradil derivative NNC55-0396, a specific T-type calcium channel antagonist, exhibits less CYP3A4 inhibition than mibefradil. *Drug Metabolism and Disposition*, 36(7), 1291–1299.
63. Veronese, M. L., Gillen, L. P., Dorval, E. P., Hauck, W. W., Waldman, S. A., & Greenberg, H. E. (2003). Effect of mibefradil on CYP3A4 in vivo. *Journal of Clinical Pharmacology*, 43(10), 1091–1100.

64. Heady, T. N., Gomora, J. C., Macdonald, T. L., & Perez-Reyes, E. (2001). Molecular pharmacology of T-type Ca^{2+} channels. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 85(4), 339–350.
65. Martin, R. L., Lee, J. H., Cribbs, L. L., Perez-Reyes, E., & Hanck, D. A. (2000). Mibefradil block of cloned T-type calcium channels. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 295(1), 302–308.
66. McNulty, M. M., & Hanck, D. A. (2004). State-dependent mibefradil block of Na^+ channels. *Molecular Pharmacology*, 66(6), 1652–1661.
67. Bezprozvanny, I., & Tsien, R. W. (1995). Voltage-dependent blockade of diverse types of voltage-gated Ca^{2+} channels expressed in *Xenopus* oocytes by the Ca^{2+} channel antagonist mibefradil (Ro 40-5967). *Molecular Pharmacology*, 48(3), 540–549.
68. Uebele, V. N., Nuss, C. E., Fox, S. V., Garson, S. L., Cristescu, R., Doran, S. M., Kraus, R. L., Santarelli, V. P., Li, Y., Barrow, J. C., Yang, Z.-Q., Schlegel, K.-A. S., Rittle, K. E., Reger, T. S., Bednar, R. A., Lemaire, W., Mullen, F. A., Ballard, J. E., Tang, C., Renger, J. J. (2009). Positive allosteric interaction of structurally diverse T-type calcium channel antagonists. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 55(2), 81–93.
69. Chavez-Colorado, E. (2015). Bases moleculares en la interacción del bloqueador TTA-A2 en el canal $\text{Ca}_v3.1$. Tesis Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 99 pp.
70. Payandeh, J., Gamal El-Din, T. M., Scheuer, T., Zheng, N., & Catterall, W. A. (2012). Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states. *Nature*, 486(7401), 135–139.
71. Tao, E., & Corry, B. (2022). Characterizing fenestration size in sodium channel subtypes and their accessibility to inhibitors. *Biophysical Journal*, 121(2), 193–206.
72. Eberhardt J, Santos-Martins D, Tillack AF, Forli S. (2021). AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *J Chem Inf Model*. 61(8):3891-3898.
73. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 25(13):1605-12
74. Zhao, Y., Huang, G., Wu, Q., Wu, K., Li, R., Lei, J., Pan, X., & Yan, N. (2019). Cryo-EM structures of apo and antagonist-bound human $\text{Ca}_v3.1$. *Nature*, 576(7787), 492–497.
75. Horton, R. M. (1995). PCR-mediated recombination and mutagenesis. SOEing together tailor-made genes. *Molecular Biotechnology*, 3(2), 93–99.
76. He, L., Yu, Z., Geng, Z., Huang, Z., Zhang, C., Dong, Y., Gao, Y., Wang, Y., Chen, Q., Sun, L., Ma, X., Huang, B., Wang, X., & Zhao, Y. (2022). Structure, gating, and pharmacology of human $\text{Ca}_v3.3$ channel. *Nature Communications*, 13(1), 2084.