

# HUMANIDADES, CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN EN PUEBLA

ACADEMIA JOURNALS



OPUS PRO SCIENTIA ET STUDIUM

ISSN 2644-0903 online

VOL. 2, NO. 1, 2020

[WWW.ACADEMIAJOURNALS.COM](http://WWW.ACADEMIAJOURNALS.COM)

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN AUSPICIADO POR EL CONVENIO CONCYTEP-ACADEMIA JOURNALS



VANESA PELCASTRE NERI

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA CORRIENTE DE CALCIO CAV3 -TIPO T- EN NEURONAS  
AFERENTES VESTIBULARES DE LA RATA

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

DIRECTOR: DR. ENRIQUE SOTO EGUIBAR

COMITÉ TUTORIAL: DR. JESÚS ANGEL TAPIA LOPEZ

COMITÉ TUTORIAL: M. EN C. MONTSERRAT VAZQUEZ BALBUENA

NÚMERO DE SECUENCIA 2-52



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

a FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TÍTULO DE LA TESIS

Caracterización funcional de la corriente de calcio  
 $\text{Ca}_v3$  -tipo T- en neuronas aferentes vestibulares de  
la rata

Tesis que para obtener el título de  
**LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

PRESENTA:

VANESA PELCASTRE NERI

DIRECTOR: Dr. Enrique Soto Eguibar  
Comité tutorial: Dr. Jesús Angel Tapia Lopez  
Comité tutorial: M. en C. Montserrat Vazquez Balbuena

Aprobada el 26 de marzo del año 2020



## RESUMEN

*Caracterización funcional de la corriente de calcio Cav3- tipo T- en neuronas aferentes vestibulares de la rata.*

Vanesa Pelcastre Neri

El sistema vestibular se localiza en el oído interno y se compone de cinco órganos sensoriales. Tres canales semicirculares (anterior, posterior y horizontal), el utrículo y el sáculo. Cada uno de estos órganos posee receptores sensoriales que transducen el movimiento de la cabeza, tanto las aceleraciones lineales como angulares, en potenciales receptores, a un lenguaje químico de neurotransmisores para después generar potenciales de acción en las neuronas aferentes vestibulares. La dinámica de las aferentes es integrada junto con información propioceptiva y visual en los núcleos vestibulares para estabilizar la mirada, mantener el equilibrio y contribuir en la generación de un marco de referencia espacial. Los patrones de descarga de las neuronas aferentes vestibulares (NAV) son esenciales en la codificación de la información sensorial.

A pesar de que se han encontrado correlaciones en el tamaño de los somas de las NAV, la entrada sináptica, la morfología de las células ciliadas y su distribución en el neuroepitelio sensorial, las propiedades de disparo de las NAVs no pueden ser explicadas solamente por estas características. Se ha establecido que las propiedades intrínsecas de las neuronas (entre ellas la expresión y densidad de canales iónicos en la membrana de las NAVs) contribuyen a establecer el patrón de descarga. Preparaciones semi-intactas del sistema vestibular, que mantienen la sinapsis entre las células ciliadas y las terminales aferentes vestibulares han revelado que la fase de posthiperpolarización en las NAV es clave para determinar la regularidad de descarga. Algunas de las corrientes que participan en esta fase son la corriente activada por hiperpolarización ( $I_h$ ), la corriente de calcio tipo T (LVA), la corriente de potasio dependiente de calcio ( $IK_{Ca}$ ), la corriente de potasio dependiente de sodio ( $IK_{Na}$ ), la corriente de potasio activada a bajos voltajes ( $IK_{LV}$ ). La corriente de calcio tipo T tiene una distribución diferencial en los somas de las NAV. Debido a su participación en la excitabilidad celular y en oscilaciones que generan PA espontáneos en otros sistemas, este proyecto tuvo como objetivo determinar el papel funcional de la corriente de calcio tipo T sobre la frecuencia y regularidad de descarga de las NAV. Para ello se realizaron registros electrofisiológicos de las NAV en

cultivo primario (obtenidas de ratas CII P7-P10) con la técnica de célula completa y con parche perforado.

Los resultados muestran que las NAVs presentan una corriente de calcio activada a bajos voltajes (LVA) que al ser bloqueada con Níquel a 100  $\mu\text{M}$  aumenta la latencia al pico del PA, su duración al 50% y disminuye la tasa máxima de repolarización (TMR). En cuanto a la regularidad de descarga se observa una reducción en el número de PA (el número de PA promedio control fue de  $101 \pm 8$ , pasando a  $29 \pm 5$  PA) tras aplicar el bloqueador de la corriente LVA, Níquel 100  $\mu\text{M}$ . Todo lo cual demuestra que la corriente de calcio tipo T tiene una participación relevante en la determinación de la descarga repetitiva de las NAVs.

## **ANEXOS**

### **Tabla de abreviaturas**

NAV Neuronas aferentes vestibulares

LVA Activados a bajos voltajes (Low-voltage-activated)

HVA Activados a altos voltajes (High-voltage-activated)

PA Potenciales de acción

$I_h$  Corriente activada por hiperpolarización

$IK_{Ca}$  Corriente de potasio dependiente de calcio

$IK_{Na}$  Corriente de potasio dependiente de sodio

$IK_{LV}$  Corriente de potasio activada a bajos voltajes

$I_A$  Corriente de potasio transitoria de activación rápida

TMR Tasa máxima de repolarización

TMD Tasa máxima de despolarización

CV Coeficiente de variación

MET Canales de Mecanotransducción (Mechano-electric-transducer)

$Ca_v$  Canales de calcio activados por voltaje

NMDA N-metil-D-aspartato

AMPA Ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

PHP Posthiperolarización

mEPSP Potenciales postsinápticos excitatorios miniatura

4 AP 4-Aminopiridina

TEA Tetraetilamonio 5

TTX Tetrodotoxina

NK1 Neurokinina I

PLC $\beta$  Fosfolipasa C $\beta$

PKC Proteína cinasa C

PKA Proteína cinasa A

CFR-1 Corticotropina 1

cAMP Adenosín monofosfato cíclico

CHO Células de ovario de hámster chino (chinese hámster ovary)

CaMKII Ca<sup>2+</sup>/Calmodulina proteína kinasa II

DMSO Dimetil sulfóxico

ADP Postdespolarización (After-depolarization)

V<sub>m</sub> Voltaje de membrana

R<sub>m</sub> Resistencia de membrana

R<sub>a</sub> Resistencia de acceso

C<sub>m</sub> Capacitancia de membrana

$\tau$ <sub>m</sub> Constante temporal de membrana

R<sub>in</sub> Resistencia de entrada (input-resistance)

$G_{ion}$  Conductancia del ion

$I_{ion}$  Corriente iónica

## ÍNDICE

<b>ANEXOS</b> .....	iv
<b>Tabla de abreviaturas</b> .....	iv
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	viii
<b>RESUMEN</b> .....	ii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>Sistema vestibular</b> .....	1
<b>Actividad eléctrica en las neuronas aferentes vestibulares</b> .....	8
<b>Canales de calcio dependientes de voltaje</b> .....	10
<b>Moduladores de los canales de calcio tipo T</b> .....	16
<b>Canales de calcio activados por voltaje en las neuronas aferentes vestibulares</b> .....	18
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	20
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	20
<b>HIPÓTESIS</b> .....	21
<b>OBJETIVOS</b> .....	21
<b>Objetivo general</b> .....	21
<b>Objetivos específicos</b> .....	21
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	22
<b>Respeto de los lineamientos bióticos institucionales</b> .....	22
<b>Cultivo de neuronas aferentes vestibulares</b> .....	22
<b>Soluciones</b> .....	23
<b>Fármacos</b> .....	23
<b>Registro electrofisiológico</b> .....	23
<b>Protocolos para el estudio de la corriente LVA</b> .....	24
<b>Análisis de registros</b> .....	25
<b>RESULTADOS</b> .....	26
<b>Propiedades pasivas</b> .....	26

<b>Registro de corriente de calcio .....</b>	<b>27</b>
<b>Participación de la corriente LVA en los PA.....</b>	<b>30</b>
<b>Soluciones normales en modalidad célula completa con Níquel.....</b>	<b>31</b>
<b>Participación de la corriente LVA en la excitabilidad.....</b>	<b>33</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>34</b>
<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>37</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>37</b>



## **AGRADECIMIENTOS**

*Quiero agradecer principalmente a mis padres que gracias a su educación y amor estoy en donde estoy y en donde estaré.*

*Al Dr. Enrique Soto que me inició en el mundo de la investigación científica y desde el principio no dudó en mis capacidades y siempre me alentó a seguir adelante, además de darme la confianza de poder ocupar el material y reactivos del Laboratorio de Neurofisiología Sensorial, a la Dra. Rosario, Dra. Citlali, Dra. Aida y al Dr. Seseña que siempre me brindaron sus conocimientos cuando lo necesitaba y, por supuesto, a mis compañeros de laboratorio que también estuvieron sacándome de dudas y apuros en mis experimentos de los cuales también encontré a buenos amigos.*

*A los revisores la MSc. Montserrat Vázquez Balbuena y el Dr. Jesus Ángel Tapia López por tomarse el tiempo en leer y perfeccionar mi tesis*

*Y a todas esas personas no pertenecientes al ámbito científico, mi esposo, familia y amigos, que me han apoyado en todo momento de manera incondicional y han permanecido a mi lado en los momentos en que más les necesitaba.*

*Y finalmente al Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla (CONCYTEP) la concesión de la beca tesis la cual me permitirá terminar con el proceso de titulación.*

*A CONACyT, ya que gracias al financiamiento del proyecto Fronteras de la Ciencia 1544 a ES pude realizar este proyecto*

*A todos, mi más sincera gratitud.*



## INTRODUCCIÓN

### Sistema vestibular

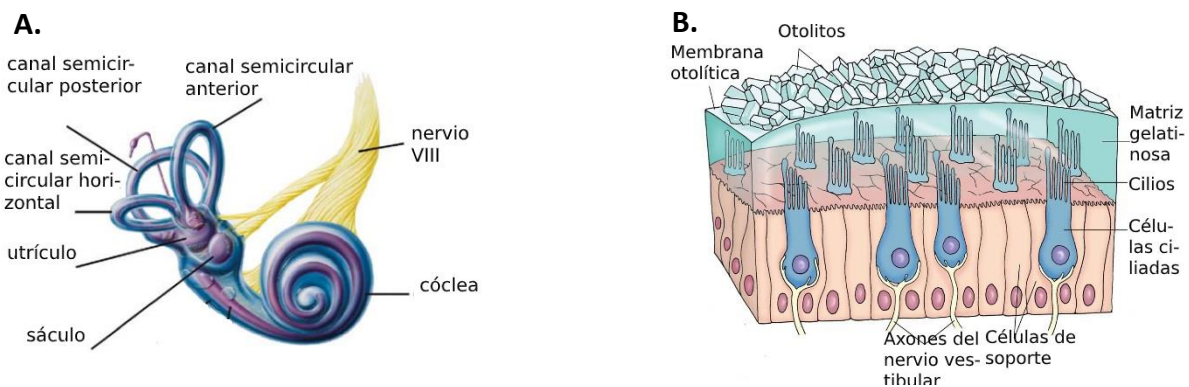
El sistema vestibular se localiza en el oído interno y se compone de cinco órganos sensoriales: tres canales semicirculares (anterior, posterior y horizontal), el utrículo y el sáculo (Goldberg *et al.*, 2012) (Figura 1A). Cada uno de estos órganos posee receptores sensoriales que transducen el movimiento de la cabeza, tanto las aceleraciones lineales como angulares, en potenciales receptores a un lenguaje químico de neurotransmisores para generar potenciales de acción en las neuronas aferentes vestibulares (NAV) (Binetti, 2015) todos detectan el movimiento de la cabeza en un espacio tridimensional (tres ejes de traslación y tres ejes de rotación) para proporcionar al sujeto una estimación en tiempo real de su movimiento (Cullen, 2019).

En el utrículo y el sáculo se encuentra una región especializada denominada mácula, que está integrada por células receptoras sensoriales ciliadas, sobre las cuales se encuentra la membrana otolítica la cual contiene cristales de Carbonato de Calcio que reciben el nombre de otolitos. Estos funcionan en conjunto como una masa inercial que permite la detección de la aceleración lineal de la cabeza (gravedad y desplazamientos) en tres dimensiones.

Los canales semicirculares están orientados en los tres planos del espacio y detectan la rotación de la cabeza en tres planos ortogonales, además, presentan una dilatación en su parte inferior denominada "Ampolla", en el interior de la cual se encuentra un órgano del equilibrio, que recibe el nombre de cresta ampular. La cresta ampular está integrada por células sensoriales receptoras ciliadas, que están recubiertas por una membrana gelatinosa en forma de cúpula. Estas células descansan sobre otras de tipo conjuntivo, y están conectadas con las NAV que forman el nervio vestibular. De acuerdo con su origen en el ectodermo de la superficie embrionaria, cada órgano está revestido con una lámina continua de células epiteliales. Por la acción de las bombas de iones,

ciertas células en este epitelio producen la endolinfa, un líquido extracelular especial que baña las superficies celulares apicales. Al igual que la endolinfa coclear, este líquido es rico en  $K^+$  ( $>100$  mM) pero relativamente pobre en  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  (10 mM). Un complejo de unión que rodea el ápice de cada célula incluye uniones estrechas que separan la endolinfa del fluido extracelular ordinario, la perilinfa, que rodea el laberinto membranoso y baña las superficies epiteliales basolaterales (Kandel *et. al.*, 2000).

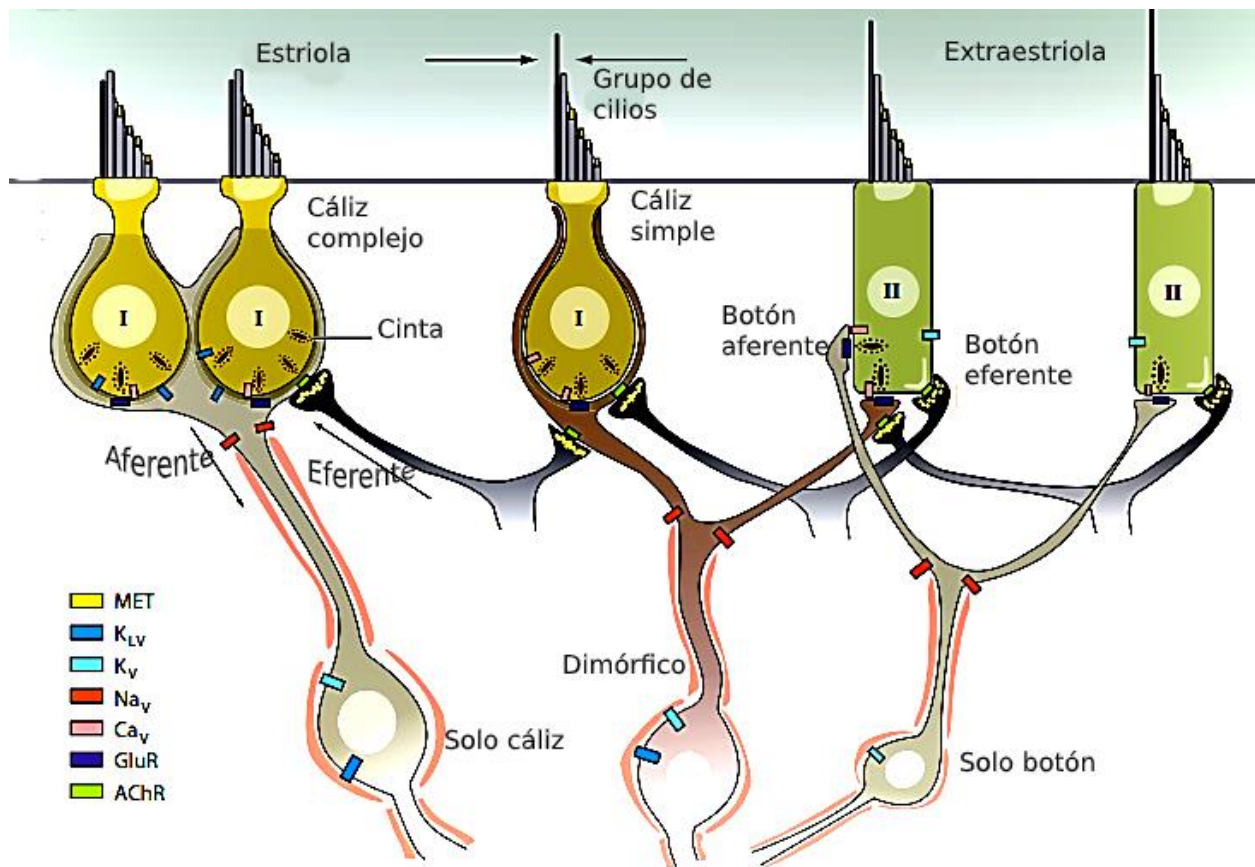
Para sensor las aceleraciones lineales, las maculas (áreas sensoriales) de los receptores otolíticos (Figura 1B) poseen un tejido conectivo que sostiene a las células ciliadas (receptores sensoriales del sistema vestibular) las cuales poseen cilios en su superficie apical, éstos entran en contacto con la ámpula de estructura viscoelástica similar a la cúpula de los canales semicirculares, que apoya sobre ellas (Bartual *et. al.*, 1999). Las células ciliadas de los vertebrados además de tener estereocilios poseen un cilio verdadero, formado de microtúbulos con su arreglo 9+2, llamado quinocilio (Flores *et. al.*, 2001). Los movimientos de los cilios en dirección al quinocilio excitan y en sentido contrario inhiben a las células ciliadas. Es importante mencionar que las células ciliadas durante el reposo presentan una liberación continua de neurotransmisor. Esto provoca que las NAVs que las inervan tengan una descarga espontánea en ausencia de estimulación (Kandel *et. al.*, 2000).



**Figura 1.** Ilustración esquemática del sistema vestibular y los diversos órganos sensoriales que se encuentran. **A.** Esquema de la estructura del oído interno incluyendo la cóclea y el vestíbulo. **B.** Se muestran las máculas otolíticas. Tomado de Marcotti, 2010.

El peso de la masa otolítica es mayor que el peso específico del medio circundante. El peso del otolito provoca un estímulo constante que nos permite sentir la atracción gravitacional de la tierra, ya que la gravedad atrae a los otolitos y deflexiona los esterocilios y, a la vez, ante cualquier aceleración lineal el ligero retraso inercial de la masa otolítica respecto a la aceleración cefálica produce un retraso relativo de la misma y con esto desplaza los estereocilios, estimulando a los receptores. A este ligero retraso se le denomina fuerza de cizallamiento y así se activan estos receptores, con movimientos en el plano principalmente horizontal al utrículo y en plano fundamentalmente vertical al sáculo (Binetti, 2015).

De acuerdo con su inervación, las células ciliadas se dividen en tipo I y II. Las células ciliadas tipo I están inervadas por una terminación en cáliz de las NAVs y las neuronas eferentes vestibulares hacen contacto con el cáliz de las NAV. Las células ciliadas tipo II son inervadas por una terminación en botón de las NAV, y las neuronas eferentes vestibulares hacen contacto directo con las células ciliadas. Otras NAV pueden tener terminales llamadas dimórficas, estas hacen contacto en forma de cáliz con una célula ciliada y contacto en forma de botón con otra célula ciliada (Kandel *et. al.*, 2000, Figura 2).



**Figura 2.** Se muestra los dos tipos de células ciliadas y sus terminaciones aferentes. Las células ciliadas de tipo I tienen un final de cáliz grande que envuelve toda su superficie basolateral, mientras que las células ciliadas de tipo II se ponen en contacto con las terminaciones de los botones aferentes. También se observan los distintos canales iónicos que las inervan. (Eatock, 2011).

De acuerdo al tipo de neuronas y su distribución, las NAVs son neuronas bipolares (63.9%), aunque también se han observado formas monopolares (30.6%) y multipolares (5.5%). Su potencial de membrana ( $V_m$ ) es de alrededor de  $-60$  mV y su capacitancia de membrana ( $C_m$ ) de entre 15 y 30 pF además existe una heterogeneidad de las fibras vestibulares con diámetros entre 2 y 13  $\mu m$  que está relacionada con las vías en que se dispersa la información sensorial (Soto *et. al.*, 2002). Sus somas se localizan en el ganglio vestibular también denominado ganglio de Scarpa. Las

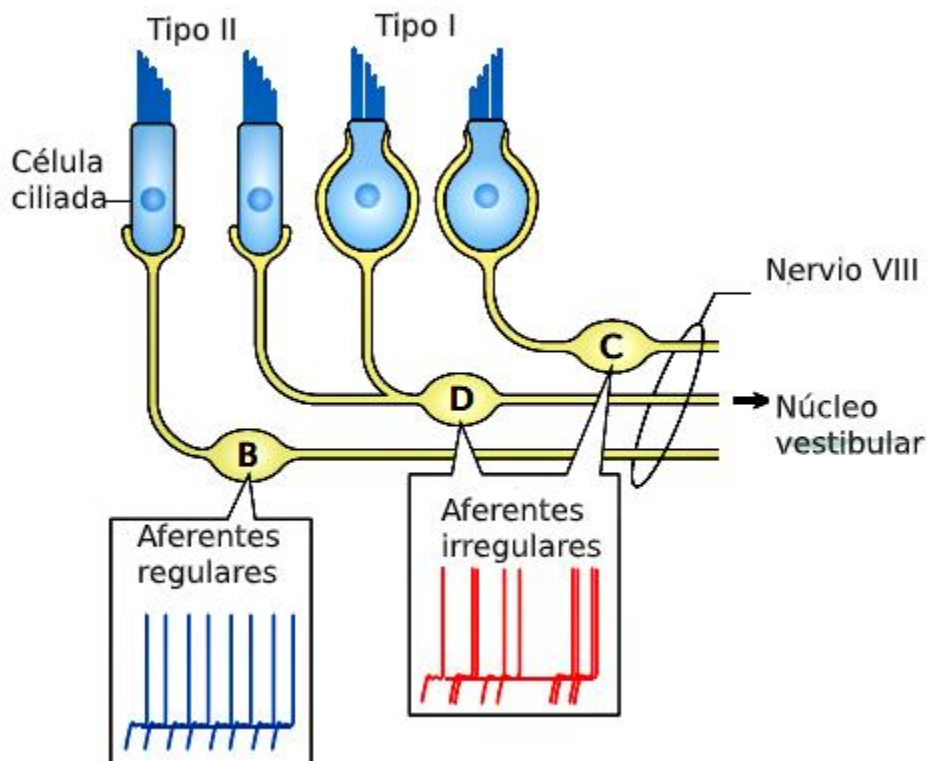
telodendritas proyectan hacia las células ciliadas y sus axones hacia los núcleos vestibulares o directamente a neuronas en el cerebelo (Bronstein & Lempter, 1997).

Las neuronas aferentes vestibulares tienen una descarga eléctrica basal que es causada por la liberación espontánea de neurotransmisor de las células ciliadas, el cual pertenece al grupo de aminoácidos excitadores (Soto & Vega, 1988; Soto *et. al.*, 1994), lo cual es sustentado por reportes que indican la presencia de glutamato por medio de sus receptores (NMDA, AMPA, kainato y aspartato) en las células ciliadas vestibulares (Soto & Vega, 2010). Las neuronas eferentes modifican la regularidad de la descarga de las neuronas aferentes (Goldberg *et. al.*, 2012; Holt *et. al.*, 2011). El principal neurotransmisor de las neuronas eferentes es la acetilcolina (ACh), aunque también se ha reportado liberación del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), sustancia P y encefalinas. Para las encefalinas la célula postsináptica posee receptores opiodes  $\mu$  en las neuronas aferentes y receptor opiode  $\kappa$  en las células ciliadas (Starr & Sewell, 1991; Vega & Soto, 2003).

Las aferentes vestibulares proporcionan información sobre la estimulación sostenida, como la aceleración de la gravedad y sobre los cambios bruscos en las aceleraciones corporales (Carriot *et. al.*, 2014). La disminución dependiente del tiempo en el disparo aferente vestibular es probable que se derive de la adaptación en varios niveles, incluido el de la transducción mecanoeléctrica por las células ciliadas y la adaptación de las fibras nerviosas (Suarez Nieto, 2003).

Las NAV de acuerdo a la regularidad en la frecuencia de disparo de potenciales de acción (PA) en condiciones basales, son clasificadas en regulares e irregulares (Goldberg & Fernández, 1977). Existe una correlación entre la morfología de las aferentes vestibulares y su regularidad de descarga. Así las neuronas con terminación de cáliz, con los somas más grandes, tienen una descarga irregular y se caracterizan por tener: axones gruesos y medianos que inervan las zonas centrales y estriolares del neuroepitelio sensorial; sinapsis en tipo de cáliz y dimórficas con las células ciliadas tipo I; respuestas fásico-tónicas; sensibilidad a la velocidad del desplazamiento de la cúpula o la otoconia; alta sensibilidad a fuerzas angulares o lineales; alta respuesta a la estimulación de las fibras eferentes; bajos umbrales a estímulos cortos y alta sensibilidad a corrientes galvánicas constantes (Eatok *et. al.*, 2008) (Figura 3). Mientras que las NAV

con terminación en botón, de tamaño pequeño, que inervan las células ciliadas tipo II, poseen una descarga regular (Férrandez *et. al.*, 1988; Eatock *et. al.*, 2008; Goldberg *et. al.*, 2012) y se caracterizan por tener: axones medianos y delgados que inervan las zonas periféricas extraestriolares; sinapsis en forma de botón; respuestas tónicas que son las esperadas para la macromecánica de los órganos vestibulares; baja sensibilidad a las fuerzas lineales y angulares y baja sensibilidad a la estimulación eléctrica de las fibras eferentes (Eatock *et. al.*, 2008).



**Figura 3.** Los aferentes regulares, que tienen potenciales de acción de descarga regular (trazo azul), forman terminaciones nerviosas de botón en las células ciliadas de tipo II (B). Las aferentes irregulares, que tienen una mayor variabilidad en su descarga en reposo (trazo rojo), inervan las células ciliadas tipo I con terminaciones nerviosas del cáliz (C) y hacen sinapsis con las terminaciones nerviosas dimórficas (mezcla de botón y cáliz D). Tomada de Cullen, 2019.

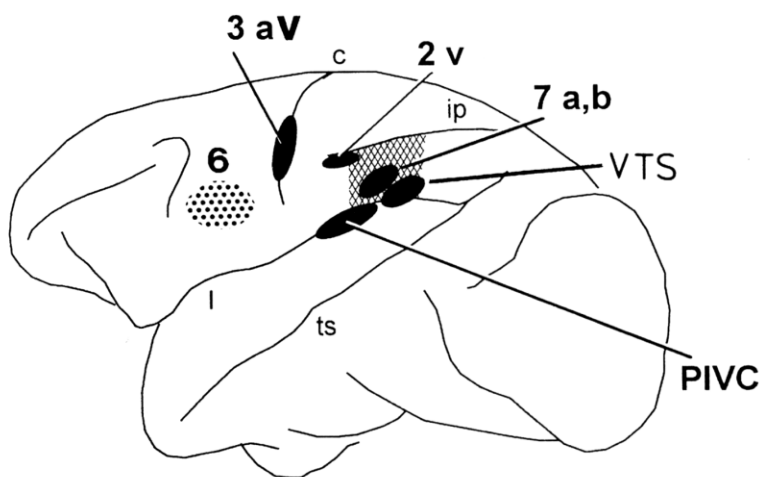
Las neuronas aferentes vestibulares proyectan a los núcleos vestibulares. Estos núcleos también reciben entradas propioceptivas mayormente durante el movimiento corporal, e independientemente del movimiento cefálico, lo que les permite integrar el movimiento corporal a la información vestibular. El sistema vestibular tendría entonces



una función polimodal relacionada con la sensación de movimiento propio del individuo, la memoria espacial, la navegación en el espacio, la propiocepción y el aprendizaje espacial (Hitier *et. al.*, 2014). Por otro lado, también el cerebelo recibe información de los núcleos vestibulares, la mayor parte de estas proyecciones terminan en el nódulo y la úvula. Otro grupo de proyecciones se dirigen bilateralmente al flocculo y núcleo fastigio, núcleo interpósito y vermis posterior (Gil-Carcedo *et. al.*, 2004).

A través de la dinámica de actividad eléctrica de estas vías, se generan reflejos que son esenciales para la bipedestación, la estabilidad visual y el equilibrio general del individuo: son los reflejos vestibulo-ocular (la estabilización visual durante movimientos de la cabeza), vestibulo-cervical (el mantenimiento de la posición de la cabeza) y vestibulo-espinal (función del equilibrio) y la generación de un mapa para la navegación inercial y la cognición espacial (Purves *et. al.*, 2004).

Además, se ha encontrado que el sistema vestibular tiene representación cortical en las áreas: 2v, en el vértice de la cisura intraparietal; 3av, en la cisura central; 7, en el lóbulo parietal inferior y la corteza parietoinsular adyacente a la parte posterior de la ínsula (PIVC) (Figura 4), (Schubert & Shepard, 2008).



**Figura 4.** Áreas que reciben información vestibular. Área 2v en la parte anterior de la cisura intraparietal (movimientos oculares), área 3a en la cisura central (codifican la representación somatosensorial), área 6 (guía sensorial del movimiento), área 7 multisensorial en la corteza parietal inferior (forma la corteza somatosensorial secundaria y participa en la coordinación visual-motor). Tomada de Brandt, 1999.

## Actividad eléctrica en las neuronas aferentes vestibulares

Las NAV se dividen, con base en su descarga ante pulsos de corriente en neuronas con descarga transitoria y neuronas con descarga sostenida. Las neuronas con descarga transitorias disparan uno o dos conjuntos de potenciales de acción independientemente del nivel de corriente, en cambio, las neuronas con descarga sostenida son más heterogéneas disparando trenes de potenciales de acción. La naturaleza regular del patrón de disparo sostenido y la amplitud y la duración de posthiperpolarización (PHP) sugieren que existe una correspondencia con la clasificación regular *in vivo*, mientras que el disparo transitorio corresponde a una descarga irregular *in vivo*. Las categorías de patrones de disparo son estables, esto es, no se modifican a diferentes temperaturas y tampoco con la edad de las ratas y ratones (Kalluri *et al.*, 2012). El disparo sostenido raramente se presenta en los días 5-7 postnatal, pero se incrementa por arriba de 60% durante la semana 2-3 postnatal.

La actividad eléctrica de las neuronas aferentes vestibulares tiene una dinámica compleja que varía en función de las aceleraciones tanto lineales como angulares, llevando información acerca de los movimientos y de la posición de la cabeza a las áreas del sistema nervioso central involucradas en el control de la postura y del movimiento de los ojos (Goldberg & Fernández, 1984). Según el coeficiente de variación de su descarga en reposo, las NAV se han clasificado en células regulares e irregulares (Goldberg & Fernández, 1977; Goldberg, 2000). Sin embargo, no existe una separación clara en dos subgrupos neuronales debido a que la regularidad de la descarga varía de las células más irregulares a las normales que forman un continuo entre todas las células (Honrubia *et al.* 1989).

La respuesta de disparo depende no sólo de las señales de entrada sináptica, sino también del filtrado impuesto por las propiedades intrínsecas de las neuronas. En muchos sistemas, las propiedades biofísicas de las neuronas tienen influencias significativas en las respuestas a las señales de entrada (Llinas, 1988; Destexhe *et al.*, 1996; Oertel, 1997). Sin embargo, poco se sabe acerca de cómo las corrientes iónicas dependientes del voltaje y el tiempo contribuyen a la dinámica temporal del disparo y a

la diversidad de propiedades de las respuestas observadas en las neuronas del núcleo vestibular.

La descarga de PA en las neuronas aferentes secundarias, que reciben información convergente de diversas fibras aferentes vestibulares con descarga de PA de tipo regular e irregular, no se asemeja a la entrada aferente en la regularidad de descarga de PA. La información de origen ampular que se transmite de las neuronas secundarias (ubicadas en el núcleo vestibular medial homolateral y desde donde parten dos uniones directas monosinápticas hacia los núcleos oculomotores) no depende de la regularidad de descarga de PA pero sí de la sensibilidad de entrada neuronal de las aferentes individuales. Se propone entonces que el patrón de las aferentes vestibulares secundarias está determinado por sus propiedades intrínsecas como la fase de despolarización una región que podría determinar la regularidad de descarga (Chen-Huang *et. al.*, 1997). En las NAVs se ha observado que tanto la posthiperpolarización (PHP) y los potenciales postsinápticos excitatorios miniatura (mEPSP) son diferentes en las terminales con descarga de PA de tipo regular e irregular. Las fibras con disparo regular tienen una PHP prominente y rápida, de -6.8 mV a 7.4 ms y decae exponencialmente con una  $\tau = 24$  ms, los mEPSP son pequeños y difíciles de identificar. Mientras que en las fibras con disparo irregular la PHP es de -1.4 mV y la  $\tau = 4.3$  ms, en éstas fibras los mEPSPs pueden observarse más fácilmente. El disparo promedio es de 16 espigas/seg en las fibras regulares y 28.6 espigas/seg en las irregulares (Goldberg & Holt, 2013).

Risner & Holt (2006) categorizaron dos poblaciones de neuronas aferentes vestibulares sin tomar en cuenta otras clasificaciones, basados en el umbral requerido para producir un potencial de acción. Neuronas de bajo umbral con una inyección de corriente en promedio mínimo de  $-43 \text{ pA} \pm 12 \text{ pA}$ , y neuronas de alto umbral que requerían  $-176 \text{ pA} \pm 106 \text{ pA}$ . Las neuronas de bajo umbral tenían una capacitancia media de  $10 \pm 4 \text{ pF}$  mientras que el valor de las neuronas de alto umbral fue de  $13 \pm 6 \text{ pF}$ . Estos autores encuentran que las conductancias de potasio sensibles a 4-AP y TEA contribuyen en el patrón de disparo de las neuronas del ganglio vestibular del ratón postnatal (P0-P12).

Las conductancias sensibles a TEA tienen su rango de activación a voltajes más positivos por ello tiene poca influencia sobre el potencial o el umbral de reposo. Tanto la conductancia sensible a 4-AP como la conductancia de K<sup>+</sup> sensible a TEA contribuyen a la posthiperpolarización alterando la amplitud y la cinética de éstas. El bloqueo de canales de potasio activados por calcio disminuye el número de potenciales de acción en neuronas aferentes vestibulares con descarga sostenida (Soto *et. al.*, 2003). Las corrientes de potasio activadas por calcio de los tipos BK e IR tienen una clara correlación con el tamaño del soma de las NAV y con la expresión de la corriente de calcio tipo T. La corriente BK se expresa en células con corriente de calcio tipo T mientras que la corriente IR se expresa fuertemente en ausencia de esta corriente. En el 60% de las NAV la corriente BK se activa a voltajes bajos lo cual parece indicar que existe un acoplamiento fisiológico con canales de calcio tipo T (Limón *et. al.*, 2005; Risner & Holt, 2006).

### **Canales de calcio dependientes de voltaje**

Los canales de calcio dependientes de voltaje tienen una historia que impacta en muchos campos de la neurociencia y la farmacología. Fueron identificados por primera vez por Fatt y Katz (1953). Más tarde, se descubrió que hay diferentes subtipos de canales en las células excitables y, en consecuencia, los canales de calcio dependientes de voltaje se clasificaron y nombraron de acuerdo con varios esquemas.

En 1975, se registraron dos corrientes entrantes de calcio provenientes de huevos de estrellas de mar fertilizados. Las propiedades biofísicas de un tipo de canal ("canal I") tenían una serie de propiedades novedosas, incluyendo la activación e inactivación a potenciales de membrana más negativos que otros canales conocidos. En contraste, el segundo canal ("canal II") era similar al canal de calcio previamente caracterizado en tejidos adultos (Hagiwara *et al.*, 1975).

La primera clasificación de los canales de Ca<sup>2+</sup> se llevó a cabo bajo propiedades farmacológicas y electrofisiológicas. Se observó que algunos sólo necesitan una pequeña despolarización para activarse, mientras que otros requieren un paso

relativamente alto en el voltaje de la membrana para abrirse (Hagiwara *et al.* 1975; Llinás & Yarom, 1981). De acuerdo con este criterio, los canales de calcio se dividieron en canales activados de umbral bajo (LVA) y activados a umbral alto (HVA). Los canales de calcio LVA se activan a un voltaje de membrana de  $-70$  mV. Estos canales también se denominaron canales de calcio tipo T (por diminutos y transitorios) debido a que la conductancia de canal unitario de los canales LVA es muy baja (entre 5 y 9 pS) y también porque su corriente es transitoria (inactivación rápida) y minúscula (conductancia pequeña). En cambio, los canales HVA tienen un umbral de activación a voltajes de membrana a  $-20$  mV (Caterall, 2011). El primer representante generalmente conocido de la familia de canales HVA se encontró abundantemente en los músculos esqueléticos, lisos y cardíacos, así como en las neuronas. Debido a su amplitud de conductancia de un solo canal y una cinética lenta de la inactivación de la corriente, se le llamó canal de calcio tipo L (L para grandes y duraderos) en contraste con el tipo T. Un distintivo farmacológico de todos los canales de tipo L es su sensibilidad a las dihidropiridinas, una amplia clase de medicamentos con acción inhibitoria (nifedipina, nisoldipina, isradipina) o activadora (Bay K 8644) en el canal.

En la década de 1980, los experimentos con células neuronales revelaron nuevos canales de calcio, insensibles a los DHP y con conductancias de un solo canal entre las de los canales de tipo T y L (Nowycky *et al.* 1985; Fox *et al.* 1987). Estos canales se denominaron canales de calcio tipo N (neuronales). Más tarde, se demostró que los canales neuronales de tipo L no podrían clasificarse en subtipos según su sensibilidad a las toxinas peptídicas aisladas de caracoles y arañas. El canal sensible a la  $\omega$ -conotoxina GVIA (toxina de *Conus geographus*) mantuvo el nombre de canal tipo N, mientras que el sensible a la  $\omega$ -Aga IVA se denominó canal tipo P / Q (P para células de Purkinje, donde este canal se caracterizó por Llinás y co-autores en 1989). Los canales resistentes a toxinas se denominaron canales de calcio tipo R (por resistente), se dividen brevemente en la Tabla 1.

Hay tres tipos de canales Cav3 (Cav3.1, Cav3.2 y Cav3.3), todos los cuales representan canales de calcio tipo T (Cribbs *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999b; Perez-Reyes *et al.*, 1998, Ertel *et al.*, 2000). Los canales Cav3 se distinguen por su sensibilidad a

níquel y resistencia relativa al bloqueo por iones de cadmio, que bloquea a todos los canales HVA en el rango milimolar bajo (Pérez-Reyes, 2003).

Las corrientes mostraron una cinética transitoria con rápida inactivación y desactivación relativamente lenta ("tipo T") (Nowycky *et al.*, 1985) que dio lugar a corrientes de cola características después de las despolarizaciones. Finalmente, las corrientes de tipo T mostraron una dependencia de voltaje distintiva de activación e inactivación, lo que resulta en una característica contrastante del patrón de corriente en respuesta a la despolarización de los canales HVA (Randall & Tsien, 1997; Perez-Reyes, 1998). También llamado "Ifast" (Bean, 1989), "tipo I" (Hagiwara *et al.*, 1975), "low-threshold inactivating (LTI)" (Kostyuk *et al.*, 1988), y "desactivación lenta" (Armstrong & Matteson, 1985). Los tipos de corrientes parecen ser la base de procesos fisiológicos por voltaje conocidas como canales de calcio voltaje-dependientes (VDCCs). A diferencia de las neuronas dependientes de activación de alto voltaje tipo P-/Q y tipo N de los canales de calcio (HVA), en la mayoría de las neuronas con corriente de calcio tipo T no aparecen directamente acopladas al neurotransmisor Ach, posiblemente por la ausencia de subunidades auxiliares (Kato T. *et al.*, 1992; Stephens *et al.*, 2001). Las corrientes de tipo T se registran a partir de miocitos cardíacos de algunas especies (Hagiwara *et al.*, 1988), en células de tejido gastrointestinal (Xiong *et al.*, 1995), bronquial (Janssen, 1997), vascular (Ganitkevich & Isenberg, 1991), y las células del músculo liso uterino (Lee S. E. *et al.*, 2009), aunque el acoplamiento excitación-contracción está mediada principalmente por la dependencia de alto voltaje de las corrientes de calcio tipo L (HVA).

En la década de 1980, la proteína del canal de calcio se purificó y se demostró que consta de varias subunidades (Borsotto *et al.* 1985; Flockerzi *et al.* 1986; Sieber *et al.* 1987; Takahashi *et al.* 1987; Leung *et al.*, 1988). La subunidad principal del canal de calcio dependiente de voltaje (VDCC) se denominó  $\alpha 1$ , y las subunidades auxiliares se denominaron  $\beta$ ,  $\alpha 2$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ . Todos los canales de calcio voltaje-dependientes poseen una subunidad alfa ( $\alpha 1$ ) que es codificada por lo menos por 10 genes distintos (Pérez-Reyes, 2003).

Respecto a su estructura, la subunidad  $\alpha 1$  (190-250 kDa) es la más grande con 1813-1873 aminoácidos y es la que forma el poro del canal, también es el sensor de voltaje que posee el sistema de apertura, aquí se localizan los sitios donde actúan los

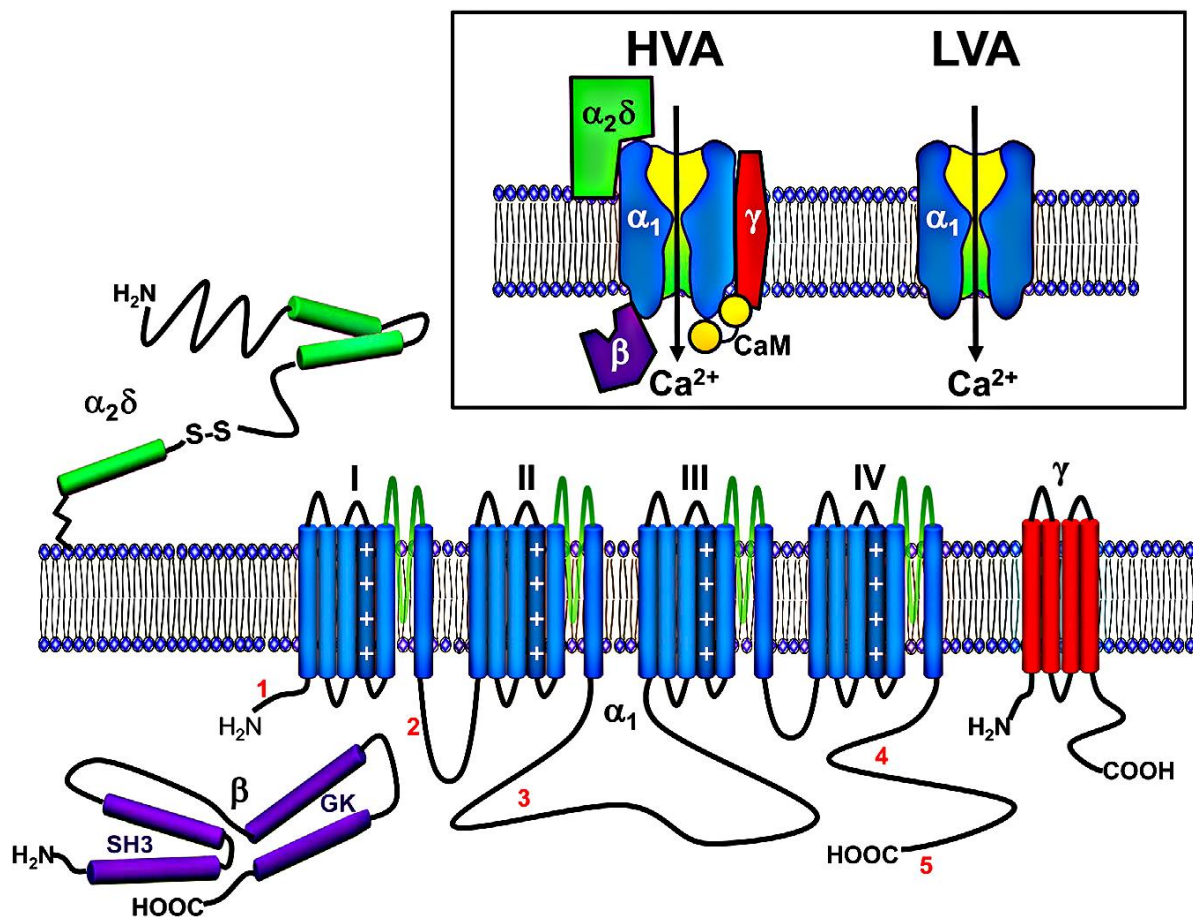
segundos mensajeros, los fármacos y las toxinas. La subunidad alfa se organiza en 4 dominios homólogos (I-IV) con aproximadamente 300 aminoácidos cada uno y 6 segmentos transmembranales (S1-S6) en cada dominio. Su terminal amino y carboxilo se ubican en el lado intracelular (Aidley, 1998; Catterall *et. al.*, 2005). El poro del canal está formado por las regiones extracelulares reentrantes (bucles p), que conectan segmentos S5 y S6 y determinan la selectividad y la conductancia del canal en cada dominio, que contienen cuatro residuos ácidos clave (glutamato o aspartato) que son responsables de la selectividad al calcio. El sensor de voltaje está formado por los segmentos S4 ricos en arginina / lisina cargados positivamente (Figura 5). El sensor de voltaje esta acoplado con el segmento S6 el cual está involucrado en la apertura del canal de Ca<sup>2+</sup> y es probablemente la compuerta de activación intracelular (Jurkovicova-Tarabova *et al.*, 2018).

Tabla 1. Tipo de canales de calcio voltaje-dependientes				
		Tipo	Subunidad α	Canal
<b>Canales HVA</b>	Neuronales tipo "L"	Tipo L	α <sub>1S</sub>	Ca <sub>v</sub> 1.1
			α <sub>1C</sub>	Ca <sub>v</sub> 1.2
			α <sub>1D</sub>	Ca <sub>v</sub> 1.3
			α <sub>1F</sub>	Ca <sub>v</sub> 1.4
	Neuronales tipo "no L"	Tipo P/Q	α <sub>1A</sub>	Ca <sub>v</sub> 2.1
		Tipo N	α <sub>1B</sub>	Ca <sub>v</sub> 2.2
Tipo R		α <sub>1E</sub>	Ca <sub>v</sub> 2.3	
<b>Canales LVA</b>		Tipo T	α <sub>1G</sub>	Ca <sub>v</sub> 3.1
			α <sub>1H</sub>	Ca <sub>v</sub> 3.2
			α <sub>1I</sub>	Ca <sub>v</sub> 3.3

Adaptada de Lacinova 2005.

Los canales de calcio tipo T, activados a bajos voltajes, difieren de los canales de calcio tipo L en la secuencia del filtro selectividad en dos residuos de aspartato en

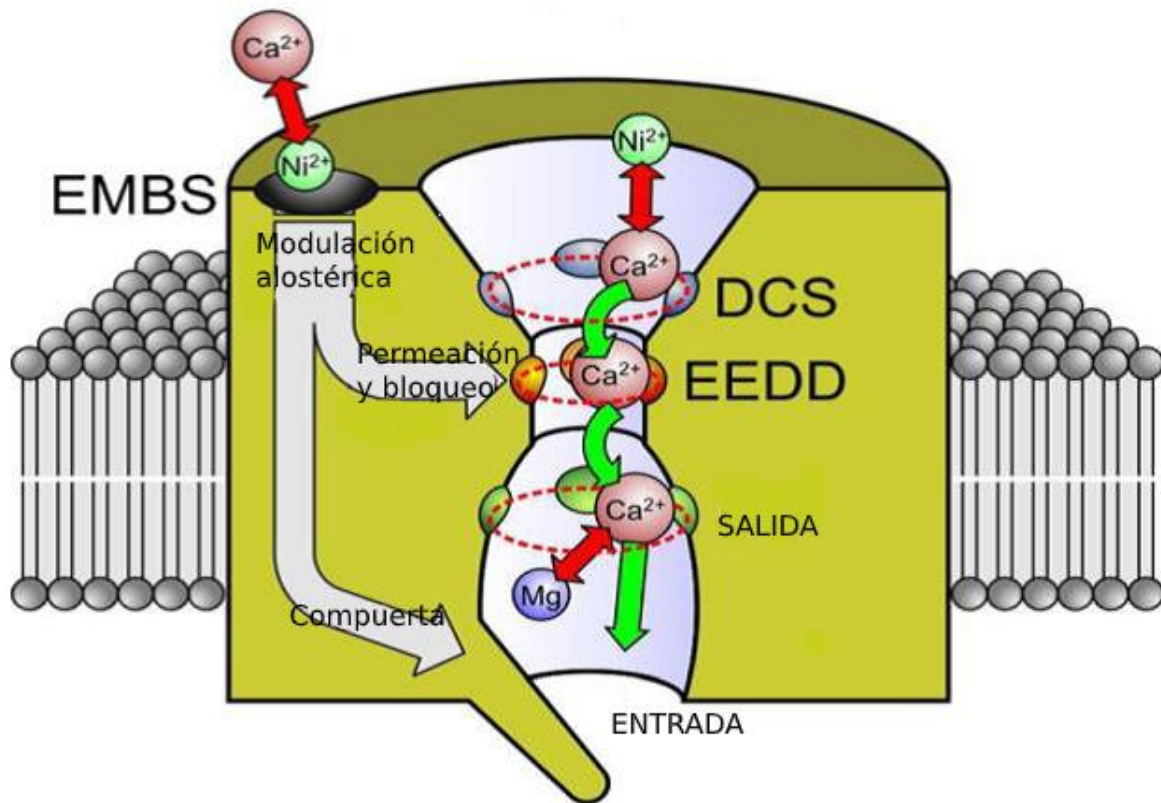
lugar de residuos de glutamato (EEDD). Los canales de calcio en general son permeables a otros iones monovalentes y divalentes en el siguiente orden  $\text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+$ . A pesar de que el  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Na}^+$  tienen diámetros idénticos (2 Å), los canales de calcio son permeables a iones de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre los iones de  $\text{Na}^+$  a una razón de 1000:1 (Sather & McClesky 2003; Garza, 2005). Dependiendo del tipo del canal de calcio se asocian subunidades auxiliares. La subunidad  $\beta$  (56 kDa) se une a los dominios I y II de la subunidad  $\alpha_1$  en la parte intracelular sobre un motivo de 18 aminoácidos y modifica la cinética del canal. Las subunidades  $\alpha_2$ - $\delta$  (155 kDa) forman un complejo unido por puentes disulfuro. También se asocia una subunidad  $\gamma$  transmembranal (35 kDa) (Catterall *et. al.*, 2005; Dolphin, 2006).



**Figura 5.** Topología de membrana de la subunidad  $\alpha$  de formación de poros  $\text{Ca}_v3$ . Consta de cuatro dominios (I a IV) formadas por seis hélices transmembrana y conectadas mediante bucles citosólicos. Los segmentos S4 (++++), ricos en arginina (R) / lisina (K) forman el sensor de voltaje, mientras que los bucles P entrantes (en verde) forman el poro del canal y proporcionan selectividad de calcio. Tomada de Simms *et. al.*, 2014.



Se ha propuesto un modelo para explicar la permeabilidad del calcio a través de los canales de calcio tipo T (Figura 6). El poro del canal tipo T tiene tres sitios de unión al calcio: el primero, representado por el clásico filtro de selectividad *locus EEDD*, el segundo, ubicado por encima del *locus EEDD* denominado sitio DCS (divalent-cation-site), y el tercero, ubicado por debajo del *locus EEDD* denominado sitio de “salida”. Estos últimos tienen una baja afinidad al calcio. El *locus EEDD* tiene la más alta afinidad para el calcio y otros iones divalentes ( $Ba^{2+}$  y  $Sr^{2+}$ ), es rígido y capaz de acomodar un ion a la vez. El calcio compite desde afuera con iones metálicos divalentes ( $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ) por el sitio DCS y con iones de magnesio desde adentro por el sitio “salida” (Shuba, 2014).



**Figura 6.** Modelo propuesto de la permeabilidad del  $Ca^{2+}$  por los canales de calcio tipo T (Corry & Hool, 2007; Shuba, 2014).

## Moduladores de los canales de calcio tipo T

Los canales de calcio tipo T se caracterizan por un potencial de membrana umbral para la activación de una corriente de entrada macroscópica de aproximadamente -70 mV, que está por debajo del umbral de potencial para la generación de potencial de acción, y es mucho más negativo que para los canales HVA. Los canales LVA se abren e inactivan muy rápido, pero desactivan de 10 a 100 veces más lento que los canales HVA en la repolarización de membrana, generando una corriente de cola, tienen una conductancia de canal unitario pequeña y similar para los iones  $Ba^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ , además de ser insensibles a DHP.

En muchas neuronas el influjo de calcio a través de canales tipo T desencadena disparos a bajos umbrales provocando ráfagas de potenciales de acción mediados por canales de  $Na^+$ . Las neuronas talámicas pueden cambiar su patrón de disparo dependiendo del voltaje al cual se fijan éstas neuronas. Se observa un patrón tónico a un  $V_h = -40$  mV y un patrón fásico a un  $V_h = -100$  mV.

En el patrón de disparo fásico se observa una fase referida como espiga de bajo umbral (LTS). Registros de fijación de corriente en neuronas talámicas aisladas en cultivo del cual muestran que ésta fase puede ser bloqueada por níquel (a una concentración 500  $\mu$ M) y que no se afectan con dihidropiridinas (Nimodipina 10  $\mu$ M) o con TTX (3  $\mu$ M). En registros de fijación de voltaje de célula completa sobre estas mismas células se observa una corriente de bajo umbral de inactivación rápida que manifiesta una dependencia de voltaje y curso temporal similar a las espigas de bajo umbral por lo que en las neuronas talámicas los canales tipo T son la base de las LTSs y por tanto juegan un papel crítico en la regulación del patrón de disparo en estas células (Suzuki & Rogawski, 1989).

Estos canales tienen tres isoformas Cav3.1, Cav3.2 y Cav3.3. Para el canal Cav3.1, los potenciales para voltajes de activación medio-máximos ( $V_{0.5act}$ ) fueron -41.8 mV y -14.7 mV en 2 mmol / l de  $Ca^{2+}$  (Monteil *et al.* 2000a). Estudios electrofisiológicos de canales recombinantes describen las propiedades cinéticas de las isoformas de  $\alpha 1$  para Cav3 y demuestran que dichas corrientes son muy similares a los canales tipo T nativos (Pérez-Reyes, 2003). Los canales tipo T requieren de un periodo precedente de

hiperpolarización para recuperarse de la inactivación y que estén listos para volverse a abrir (Cueni *et al.*, 2009). NNC 55-0396 parece ser un bloqueador selectivo de canal tipo T. A diferencia de varios informes sobre canales nativos de tipo T (Lacinová *et al.*, 2000a), ambos canales (nativos y no nativos) son resistentes tanto a las DHP agonistas como a los antagonistas. El conjunto único de propiedades biofísicas de los canales tipo T, especialmente su activación a bajos voltajes, y su capacidad de generar corrientes de calcio de ventana a potenciales cercanos al potencial de membrana en reposo, los hace ideales para regular la excitabilidad celular y los comportamientos oscilatorios (Zhang *et al.*, 2012).

En las neuronas aferentes vestibulares de la rata se ha encontrado que el receptor opioide Mu produce una inhibición de la corriente de calcio tipo T por la vía del cAMP (voltaje independiente) (Seseña *et al.*, 2014). Se ha reportado que la densidad de corriente de las tres isoformas de los canales tipo T, expresados en células de ovario de hámster chino (CHO), es potenciada por la activación de cAMP a 37°C y no a temperatura ambiente, y también la fosforilación dependiente de PKA directa al canal Cav3.2 se observa a 37°C pero no a temperatura ambiente. Esto podría reflejar la naturaleza sensible a temperatura de la cinasa. La caveolina-3 interactúa con Cav3.2 pero no con Cav3.1 para regular la modulación dependiente de PKA en miocitos ventriculares neonatos. La fosforilación por CaMKII se produce sobre los residuos de serina 1198 y 1153 en el asa que une a los dominios II-III. A diferencia de los Cav3.2, los Cav3.1 no poseen estos residuos por lo que no se modulan por CaMKII (Zhang *et al.*, 2012).

Además, la entrada de calcio por estos canales puede regular directamente las concentraciones intracelulares que participan como segundos mensajeros en una variedad de procesos. Por lo que el bloqueo de éstos canales puede contribuir a terapias con antihipertensivos, antiepilépticos, anestésicos, y posiblemente antisicóticos (Pérez-Reyes, 2003).

Existe además un sitio de unión a metales extracelulares (EMBS extracelular metal binding site) compuesto por un motivo de Asp-Gly-His en el asa que une el segmento S3-S4 del primer dominio (IS3-IS4) y un residuo aspartato en el segmento S2 del primer dominio (IS2). Análisis mutacionales combinados con pruebas funcionales de

las isoformas de los canales de calcio LVA llegan a la conclusión que la alta sensibilidad de los Cav3.2 al níquel (Figura 6), cobre, zinc, y factores redox esta principalmente determinada por este sitio. Se demostró que el sitio Histidina-191 (H-191) es quien confiere la alta selectividad del níquel a los Cav3.2 (Kang *et. al.*, 2005), mientras que las isoformas relativamente insensibles al níquel (Cav3.1 y Cav3.3) contienen glutamina en las posiciones equivalentes al sitio H-191. Más aún los datos indican que el bloqueo por el níquel, mibefradil (Strege *et. al.*, 2005) y el Zinc para los canales Cav3.2 involucran un efecto alostérico de EMBS en la compuerta del canal más que una acción directa sobre los iones que permean a través del canal de calcio tipo T (Nosal *et. al.*, 2013).

### **Canales de calcio activados por voltaje en las neuronas aferentes vestibulares**

El primer trabajo realizado sobre la distribución de conductancias iónicas de  $Ca^{2+}$  activadas por voltaje en las NAVs fue realizado por Desmadryl *et. al.* en 1997. Se investigó la presencia de corrientes de  $Ca_v$  en ganglios vestibulares de ratón post-natal usando la técnica de *patch-clamp* de célula completa. Todas las neuronas mostraron la presencia de corrientes HVA, mientras que la corriente LVA se observó sólo en las neuronas más grandes ( $17.2 \pm 2$  contra  $21.3 \pm 2 \mu m$  de diámetro).

Durante el desarrollo embrionario de las NAVs del ratón se ha observado la presencia de dos grupos de neuronas con corriente LVA, uno que a partir del estado embrionario E17-P0 la corriente LVA decrece ( $< 50$  pA/pF), y otro en el cual la corriente incrementa durante el estado E17-P4 ( $> 50$  pA/pF). En la etapa embrionaria E17 del epitelio sensorial vestibular del ratón es donde existe el principal periodo de crecimiento neuronal, a partir de esta etapa hasta el nacimiento se presenta un desarrollo substancial de contactos sinápticos entre las aferentes primarias y las células ciliadas (Chambard *et. al.*, 1999).

Autret *et. al.* (2005) reportan que un 70% de las NAV expresan corriente LVA, y Limón *et. al.* (2005) identifican dos grupos evidentes para las NAV, uno con presencia de corriente, LVA (+), alrededor del 74% en células grandes y medianas ( $39 \pm 15$  pF) y otro grupo sin esta corriente, LVA (-), que representan el 26% de las células pequeñas ( $18.5 \pm 7$  pF). Así mismo sus propiedades biofísicas son diferentes, las corrientes de calcio en

las células que carecen de la LVA se activan a un voltaje de -45 mV, se inactivan parcialmente durante un pulso de 800 ms, su máxima amplitud es alrededor de -10 mV y su densidad de corriente al pico máximo en éstas células es de  $-30 \pm 6$  pA/pF. Mientras que las neuronas que expresan LVA, la corriente de calcio se activa alrededor de -60 mV, se inactivan completamente a  $31 \pm 2$  ms y su densidad de corriente es de  $-49 \pm 8$  pA/pF (Desmadryl *et. al.*, 1997; Chambard *et. al.*, 1999; Autret *et. al.*, 2005; Limón *et. al.*, 2005). Así también Rangel y colaboradores reportan (en 2016) que el  $\text{Ni}^{2+}$  a  $[300\mu\text{M}]$  modifica la morfología de los potenciales de acción (PA), disminuyendo la amplitud y aumentando la duración del PA y disminuyendo la corriente LVA un 78% y la HVA un 58%, por otro lado, Mibefradil (un derivado de la Bencilimidazoliltetralina) disminuye la amplitud y el umbral del PA. Además, la frecuencia del disparo repetitivo generado por un largo impulso de despolarización ( $1.5 \times T$ ) se redujo después de aplicar tanto  $\text{Ni}^{2+}$  y mibefradil. La corriente LVA bloqueada con Mibefradil produjo una tendencia hacia el disparo regular. Los estímulos sinusoidales mostraron un grupo de células en las que el número de PA aumentó y otro grupo donde el número de PA disminuyó. Estos resultados mostraron que las NAV poseen una corriente de LVA y que su expresión heterogénea contribuiría a explicar algunas de las diferencias en el patrón de descarga en estas neuronas.

Los canales LVA producen una corriente de ventana entre -65 y -45 mV que es bloqueada por concentraciones micromolares de níquel, se inhibe por velocidades de perfusión rápida, pueden generar potenciales postdespolarizantes durante la fase de repolarización de los potenciales de acción, y ocasionalmente generan espigas de calcio. Con base a lo anterior Autret *et. al.*, (2005) argumentan que el subtipo Cav3.2 es la principal isoforma de los canales tipo T expresadas en las NAV, que juegan un papel importante en la excitabilidad de estas neuronas durante la ontogénesis del vestíbulo, ya que estos autores estudian la corriente de calcio tipo T durante la etapa embrionaria E17 de las neuronas vestibulares. En ensayos de fijación de voltaje en la modalidad de célula completa se ha observado una disminución de la corriente de calcio (*rundown*) en cercano al 50 % en condiciones control tras 10 minutos de registro (Seseña, 2009).

## JUSTIFICACIÓN

Los canales de calcio tipo T juegan un papel importante en la excitabilidad neuronal, se pueden detectar en diversos tejidos como el corazón, el cerebro, los ganglios de la raíz dorsal y la glándula suprarrenal. En el corazón, los canales de calcio tipo T pueden contribuir a la generación del potencial de acción en el nódulo sinoauricular, a la despolarización de las membranas celulares y a la propagación del potencial de acción de calcio aurículo-ventricular. La entrada de calcio a través del canal de tipo T juega un papel importante en el inicio de la liberación de  $Ca^{2+}$  inducida por  $Ca^{2+}$  en el corazón en desarrollo (Katz, 1999). El papel funcional de los canales de tipo T en la generación de LTSs se ha demostrado en las neuronas de la oliva inferior, el tálamo, el hipocampo y el neocórtex (Llinas & Yarom, 1981a). En la glándula suprarrenal, se postula que los canales de tipo T están involucrados en la secreción de hormonas (Cohen *et al.* 1988). También hay evidencia de que las anomalías en los genes de canal de tipo T dan lugar a epilepsia, migraña, ataxia, cardiomiopatía y dolor crónico (Sen & Smith, 1994; Tsakiridou *et al.*, 1995; Talley *et al.*, 2000), así también con trastornos del espectro autista (Lu *et al.*, 2012; Splawski *et al.*, 2006). Así también se ha observado que los canales de calcio tipo T participan en el patrón de descarga de las NAV lo cual tiene gran relevancia en la codificación de la información sensorial y en la fisiología del sistema vestibular. (Rangel *et al.*, 2016) que contribuye a un aumento transitorio en  $[Ca^{2+}]_i$ , que es probable que participe en la ontogénesis vestibular controlando el crecimiento y la guía del axón, como se describe para el desarrollo de la médula espinal embrionaria (Autret *et al.*, 2005).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las NAVs se han diferenciado en regulares e irregulares con base en el coeficiente de variación de su descarga en reposo. Además, se han correlacionado sus características morfológicas con la regularidad de descarga. Sin embargo, estas diferencias en las propiedades de disparo de las NAVs no pueden ser explicadas solamente por la entrada sináptica, por el tipo de células ciliadas que inervan y tampoco por su distribución con respecto al neuroepitelio (Holt *et al.*, 2011). Por esta razón se propone que las propiedades intrínsecas de las neuronas vestibulares, es decir, la composición de las

corrientes iónicas de membrana, puedan ser determinantes en el patrón de actividad de descarga. Por lo tanto, en este proyecto se pretende hacer la caracterización funcional de la corriente de calcio tipo T sobre el patrón de descarga de las neuronas aferentes vestibulares y responder: ¿Cuál es la dinámica funcional de la corriente de calcio tipo T en las neuronas aferentes vestibulares a una concentración de Níquel de 100 $\mu$ M? en relación a estas variables: 1) Regularidad de descarga y 2) Características de la corriente.

## **HIPÓTESIS**

La corriente de calcio tipo T contribuirá a determinar el patrón y la regularidad de descarga de las neuronas aferentes vestibulares de la rata.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Caracterización funcional de la corriente de calcio LVA sobre el patrón y la regularidad de descarga de las neuronas aferentes vestibulares de la rata.

### **Objetivos específicos**

- Identificar la corriente de calcio tipo T en las neuronas aferentes vestibulares, mediante registro de corrientes iónicas por fijación de voltaje.
- Determinar las propiedades biofísicas de la corriente de calcio tipo T, incluyendo su dependencia de voltaje, densidad de corriente y cinética del canal.
- Estudiar la participación de la corriente de calcio LVA en la morfología del potencial de acción, mediante registros de fijación de corriente con la concentración de Níquel a 100  $\mu$ M,
- Estudiar la influencia de la corriente tipo T sobre el patrón de descarga de las neuronas aferentes vestibulares, en presencia de Níquel a 100  $\mu$ M, mediante fijación de corriente.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Respeto de los lineamientos bióticos institucionales**

Las ratas neonatales (alrededor de 50) se sacrifican siguiendo la norma oficial NOM 062-ZOO-1999 y los lineamientos establecidos por el CICUAL (Comité Institucional para el Cuidado y uso de Animales de Laboratorio, BUAP) y también de acuerdo a la Ley General de Salud en Materia de la Investigación para la Salud de la Secretaría de Salud de México. El diseño experimental considera el uso mínimo en el número de animales.

### **Cultivo de neuronas aferentes vestibulares**

Para realizar el proyecto se utiliza como modelo biológico a las ratas neonatales Long-Evans de la cepa C-II de un rango de P7-P10 debido a que a esta edad ya se presenta un desarrollo del sistema vestibular además de menor mielinización de las neuronas y no se hizo distinción de peso ni sexo, las cuales se obtienen del bioterio Claude Bernard de la BUAP-CU. Las ratas fueron anestesiadas con sevoflurano (2 ml por 2 minutos) y sacrificadas por decapitación, posteriormente se remueve el maxilar inferior, se retira la piel, además, se elimina la bóveda craneana, se remueve el cerebro y cerebelo por el agujero magnum. Posteriormente, se identifican los nervios ópticos y las meninges con un estereoscopio para poder extraer los ganglios vestibulares que van a ser depositados en un tubo Corning de 15 ml con las enzimas diluidas (tripsina y colagenasa) en 2 ml de medio L 15 los cuales son incubados por 20 minutos a 37°C.

El tejido obtenido se lava 2 veces, la primera con las enzimas y la siguiente en medio L-15 y después de cada lavado el tejido se centrifuga 4 minutos a 4000 rev/min. Los ganglios vestibulares se disocian mecánica y enzimáticamente con una pipeta Pasteur con un volumen de 0.4 ml de medio L-15 modificado y suplementado. Las células se asientan en vidrios que son tratados con 100 µg/mL Poli-D-Lisina (Sigma-Aldrich®). Posteriormente las células se incuban por un tiempo aproximado de 22 ± 2 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> (Nuair®) en medio de cultivo L-15 (Gibco®) modificado y suplementado que contiene entre otros compuestos HEPES 10 mM que funciona como Buffer, NaHCO<sub>3</sub> 10 mM y 10 % de suero bovino fetal adicionado con penicilina 500 UI/ml (Merk®). Con este tratamiento las células conservan una viabilidad alta del 81 ± 3.2%. Finalmente los vidrios



con cultivo se observan con un microscopio invertido con iluminación de contraste de fases (Invertoscopio Nikon®), donde se identifican las NAV.

### **Soluciones**

Se utilizaron soluciones normales y específicas para la corriente de calcio para el registro de los potenciales de acción en las NAV. La solución externa (Tyrode®) y la solución extracelular para Calcio se ajustó a un pH = 7.4, mientras que la solución interna normal y la solución intracelular para Calcio a un pH = 7.2. La solución interna normal se adiciona con ATP-Mg 2 mM y GTP-Na 1 mM para el registro celular en la modalidad de célula completa y la solución intracelular para Calcio se adiciona con Anfotericina B [350 µM] para el registro con la técnica de parche perforado. Las soluciones se ajustaron a una osmolalidad aproximada de 300 mOsm/Kg. El uso de soluciones para Ca<sup>2+</sup> adicionadas con el bloqueador de la corriente de potasio 4-Aminopiridina (4-AP), se hizo con el fin de eliminar la fase de adaptación que tienen las neuronas durante la descarga repetitiva, usando concentraciones de 10 mM (Rangel, 2016).

### **Fármacos**

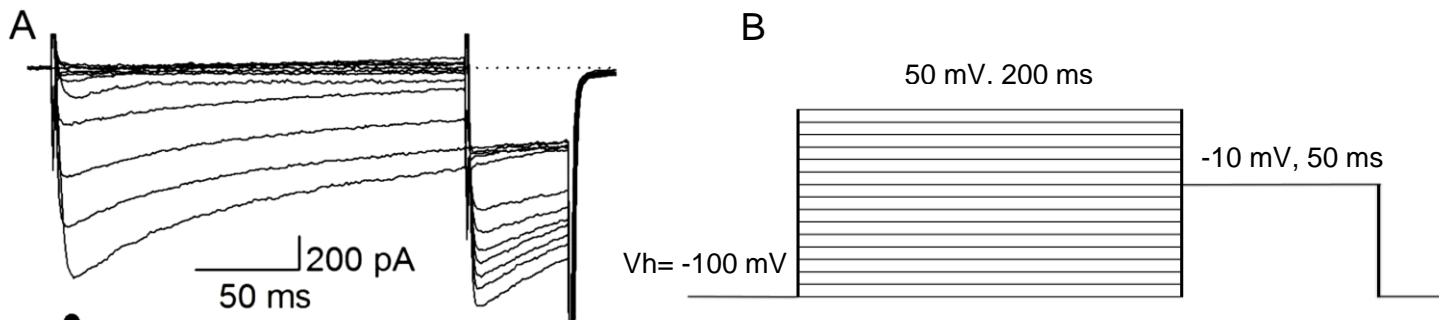
Se utilizaron como bloqueador Níquel a una concentración de 100 µM. La Anfotericina B (1mg) se utilizó para la técnica de parche perforado a una concentración de 350 µM disuelta en 50 µl de DMSO (dimetil sulfóxido). Todos los fármacos se obtuvieron de Sigma Chemicals Co®.

### **Registro electrofisiológico**

Para el registro se usó un amplificador de fijación de voltaje (HEKA, Patch Clamp, EPC 800®), un convertidor analógico-digital (AXON INSTRUMENTS Digidata 1550®) controlada por el programa Clampex v10.6 (Axon Inst. ®), en donde se visualizaron los registros electrofisiológicos de cada célula. La resistencia de los microelectrodos fue de 2.5 a 5 MΩ y la resistencia del sello excede 1GΩ. En todos los experimentos se compensa al máximo electrónicamente la capacitancia y la resistencia en serie. La aplicación de Níquel se realiza utilizando un sistema de perfusión por gravedad, para lo cual se acercó un tubo cuadrado aproximadamente 100 µm de distancia a la célula de registro.

## Protocolos para el estudio de la corriente LVA

En los registros de *fijación de voltaje* para construir la curva I-V de las corrientes de calcio usamos un protocolo que parte de un  $V_h =$  de -100 mV dando pulsos de voltaje desde -100 mV a 50 mV durante 200 ms, con incrementos de 10 mV. En el pulso estudiamos la activación de la corriente LVA y al final del pulso obtendremos la corriente de cola de componentes que no se inactiven.



**Figura 7.** Protocolo de fijación de voltaje para la corriente de calcio. **A.** Muestra un registro representativo de la corriente de calcio. **B.** Protocolo de estimulación con pulsos cuadrados para observar la corriente de calcio.

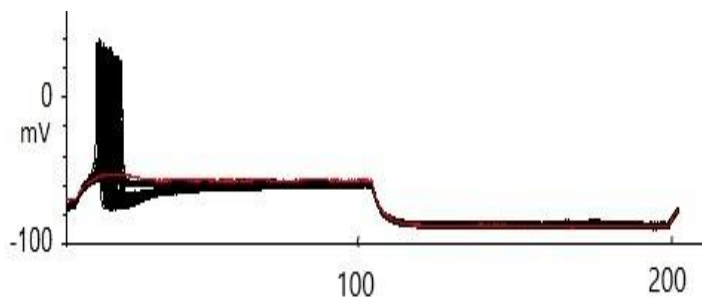
Antes de evaluar el efecto de los fármacos se tomaron registros control durante un minuto, el tiempo mínimo que se aplicó el fármaco fue de 30 segundos y las mediciones del lavado las realizamos de forma inmediata y 2 minutos después, en un lapso de 1 minuto.

En los registros de *fijación de corriente* aplicamos protocolos para evaluar la morfología del potencial de acción (PA) y el efecto de los fármacos sobre el patrón de descarga de las neuronas. El protocolo de pulsos crecientes inyecta corriente desde -200 a 1000 pA durante 200 ms, con un incremento de 100 pA entre cada pulso, la duración entre cada pulso fue de 5 segundos y el potencial de membrana -80 mV

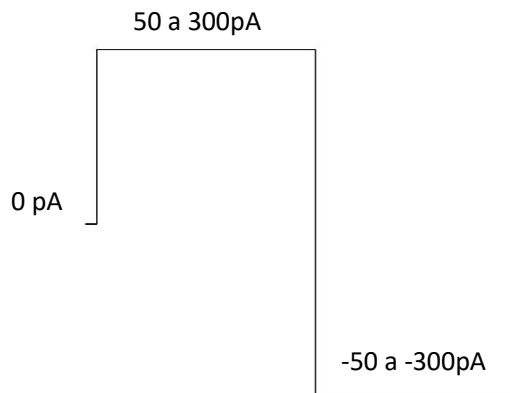
Para evaluar los cambios en el PA y el efecto del fármaco en la descarga se evaluó en un protocolo de pulsos fijos cuadrados (Figura C) que inyecta 1.5 veces el umbral (obtenido en los pulsos anteriores), 150 sweeps de 200 ms cada uno y el mínimo de tiempo entre cada pulso. Para evaluar la descarga de PA se dieron estímulos de entre

50 y 300 pA, con un rango de amplitud de 200 pA a 1 nA (ajustando la amplitud de la corriente igualmente en función del cambio de potencial que produzca) y una frecuencia de 100 kHz. La media en la resistencia de entrada de las neuronas aferentes vestibulares que se ha reportado en los experimentos realizados en el Laboratorio de Neurofisiología Sensorial se encuentran en el mismo rango (300-1000 MΩ) que los datos reportados en la literatura (Kalluri *et. al.*, 2010; Rangel, 2016).

A.



B.



**Figura 8.** Protocolo de fijación de corriente. **A.** Muestra un registro representativo del PA (tren de PA). **B.** Protocolo de estimulación de pulsos fijos cuadrados.

### Análisis de registros

En fijación de voltaje se estudiaron las propiedades pasivas de la célula, esto es la resistencia de la membrana ( $R_m$ ), la capacitancia de la membrana ( $C_m$ ), y la constante de tiempo ( $\tau_m$ ), así como también la resistencia de acceso ( $R_a$ ) con ayuda del programa Clampex 10.2 y Sigma Plot 11.0. En fijación de corriente en el modo sin inyección de corriente ( $I = 0$ ) se midió el potencial de membrana en reposo de la célula ( $V_m$ ). Para evaluar la frecuencia de descarga se contabilizó el número de potenciales de acción por cada inyección de corriente.

En el PA se mide el voltaje de membrana ( $V_m$ ), tomando un intervalo alrededor de 10 ms, se obtienen los valores promedio de varias mediciones de voltaje. La amplitud del PA se obtiene como el intervalo de voltaje que va del  $V_m$  al voltaje al pico del PA. Consideramos la fase de posthiperpolarización (PHP) como la diferencia de voltaje al

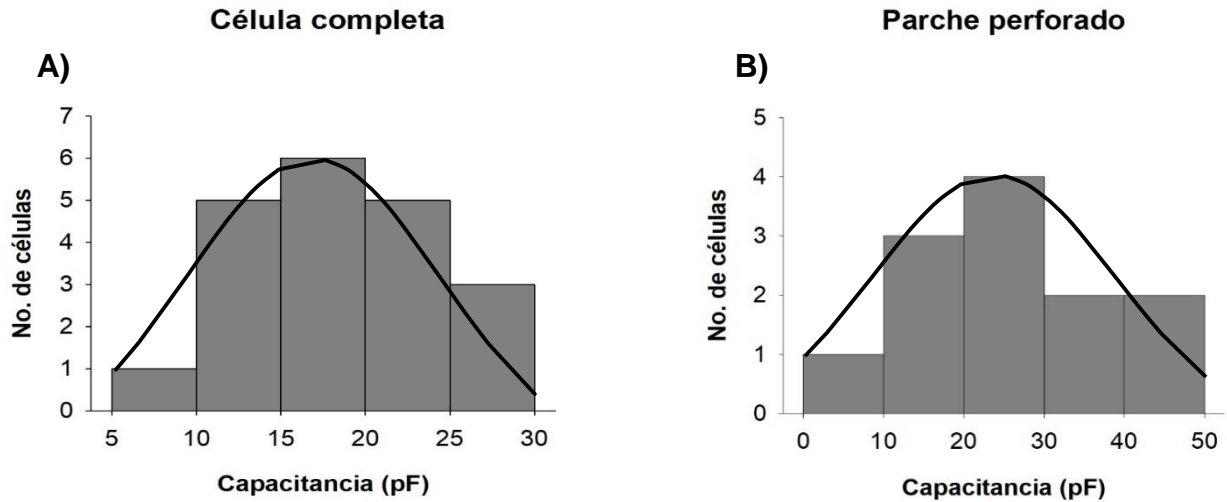
pico negativo, después de la repolarización, con respecto al  $V_m$ . La tasa máxima de despolarización (TMD) se midió como la velocidad máxima en la fase despolarizante del PA, la tasa máxima de repolarización (TMR) se midió como la velocidad máxima en la fase repolarizante del PA, y finalmente la duración medida al 50 % de la amplitud del PA.

La amplitud se midió desde el voltaje de sostenimiento al pico máximo de despolarización, el umbral y la duración al 50 % se midieron desde el inicio del pulso despolarizante. La tasa máxima de despolarización se midió entre el 50 y el 90 % de la amplitud, la tasa máxima de repolarización se midió entre el 60 y el 30 % de la amplitud (Storm, 1987), los porcentajes de la amplitud al cual se realizaron las mediciones anteriores parten desde el voltaje de sostenimiento. Todos los ajustes se realizaron con los programas Origin 5.0 (Microcal®) y Clampfit 9.0. Posteriormente se realizó un análisis estadístico para los datos obtenidos en los registros. Si los datos tienen una distribución normal se aplicó un análisis con base en la distribución *t-Student*, en caso contrario, una prueba de *Mann Whitney*. Cuando se analizaron más de dos distribuciones se usó una ANOVA para datos normales y cuando no seguían una distribución normal se llevó a cabo la prueba *Kruskal- Wallis*.

## RESULTADOS

### Propiedades pasivas

Se registraron neuronas aferentes vestibulares (NAV) aisladas, refringentes y con una membrana bien delimitada. Los valores promedios de las propiedades pasivas aparecen en la tabla 2 las cuales se obtuvieron del programa Clampex 10.2 y Sigma Plot 11.0. El voltaje de membrana promedio del total de células registradas se calculó sin tomar en cuenta a las células que se registraron con soluciones para aislar la corriente de calcio. En la figura 9 se observa la distribución de la capacitancia de membrana de las NAV en modalidad célula completa y parche perforado.



**Figura 9.** Distribución de las capacitancias en modalidad célula completa y parche perforado de las neuronas aferentes vestibulares. El rango fue de 7 a 49 pF, el promedio de  $17 \pm 5$  pF,  $25 \pm 13$  pF y la  $n = 21$  y  $12$ , respectivamente.

Se hizo una prueba Mann Whitney para las propiedades pasivas en las cuales solo en Ra hubo diferencias significativas ( $P=0.003$ ).

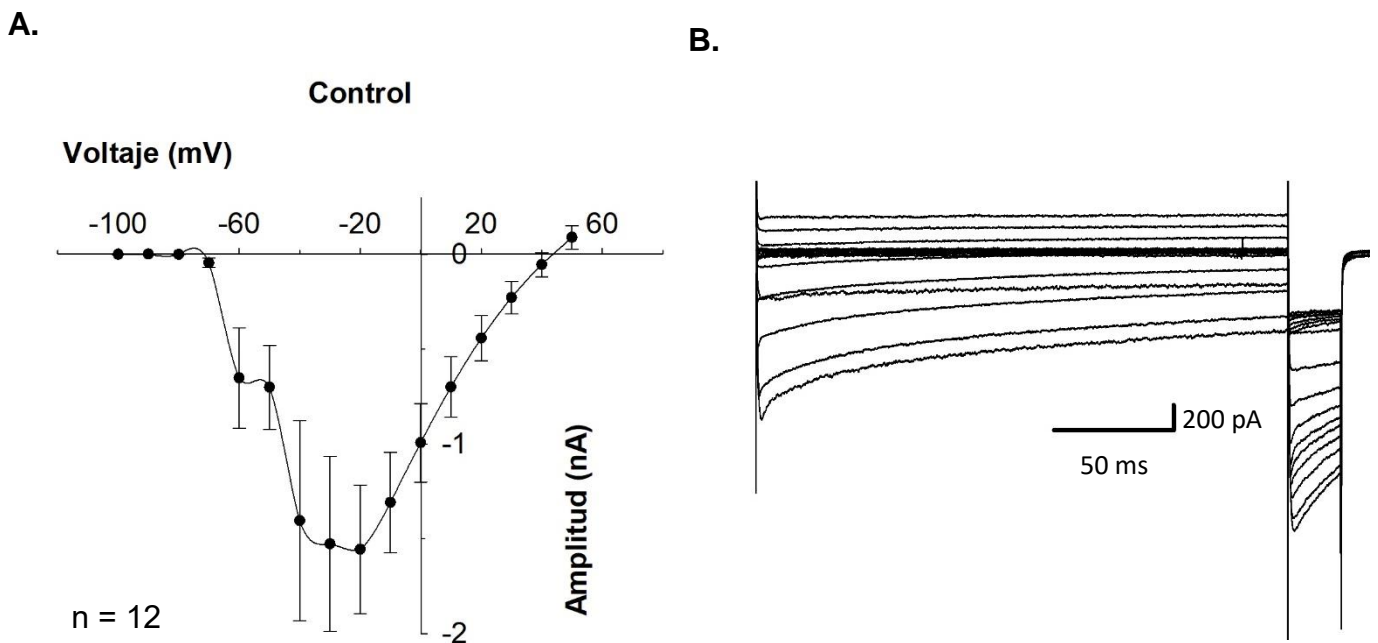
Tabla 2. Propiedades pasivas de las neuronas registradas					
	No. De células	$C_m$ (pF)	$R_m$ (M $\Omega$ )	$R_a$ (M $\Omega$ )	$T_m$ ( $\mu$ s)
<b>Ica</b>	12	$26 \pm 4$	$342 \pm 69$	$10 \pm 2$	$119 \pm 25$
<b>PA</b>	21	$17 \pm 1$	$394 \pm 84$	$4 \pm 0.3$	$77 \pm 11$

### Registro de corriente de calcio

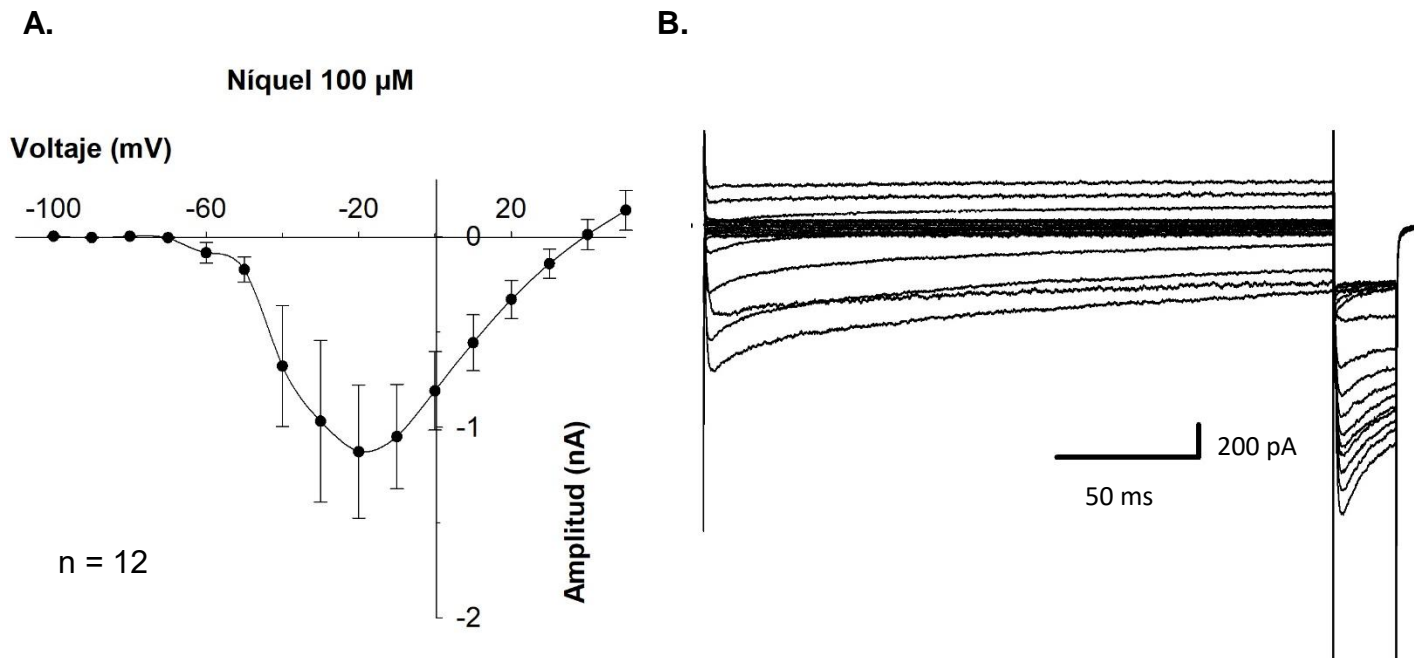
Para registrar la corriente de calcio tipo T se utilizó el bloqueador Níquel  $100 \mu$ M. Las NAV que presentaron corriente tipo T se activan en promedio alrededor de  $-60$  mV. Se

observa un pico de corriente de máxima alrededor de -10 mV y un voltaje de inversión promedio a 50 mV (Figura 10).

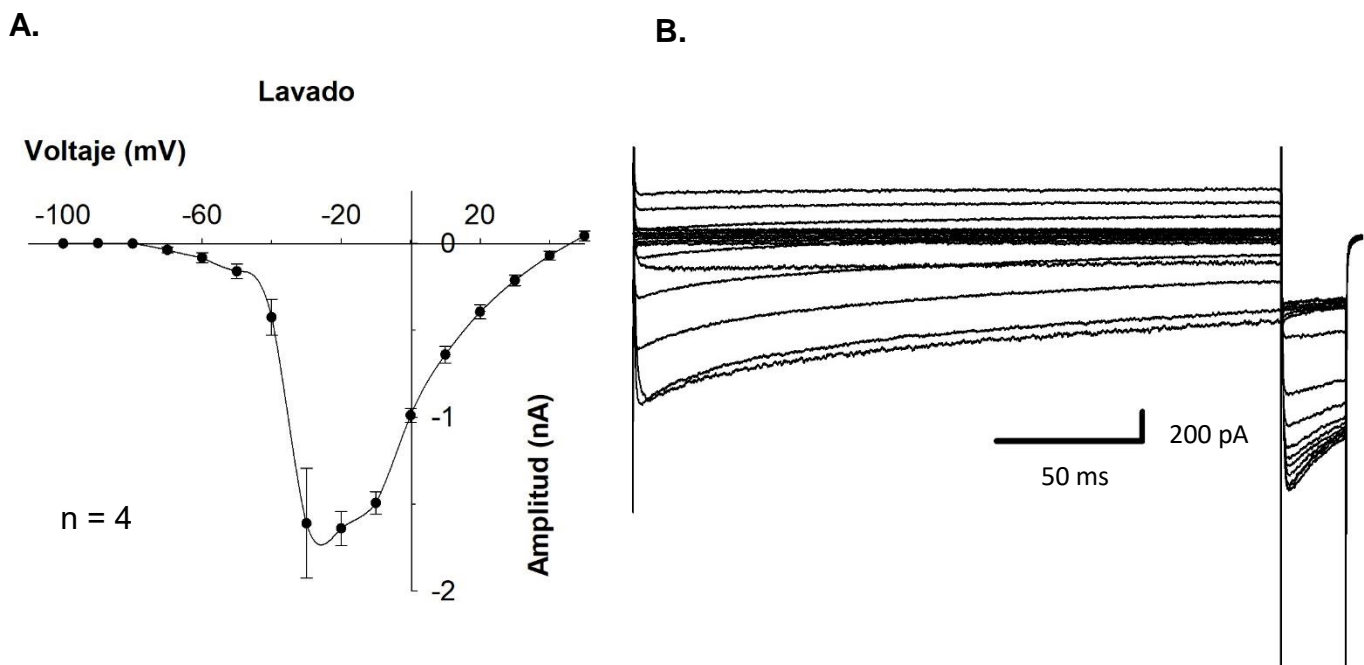
El bloqueador **Níquel aplicado a 100  $\mu\text{M}$**  reduce a la corriente LVA en un 86 %, y al componente HVA en un 24 % (Figura 11). Siendo el valor promedio de la corriente LVA de  $-0.24 \pm 0.01$  nA pasando a un valor de  $-0.06 \pm 0.0025$  nA después de la aplicación de Níquel 100  $\mu\text{M}$ , y el valor promedio de la corriente HVA de  $-0.27 \pm 0.02$  nA pasando a  $-0.28 \pm 0.02$  nA con un porcentaje de 23% de la corriente tras la aplicación de Níquel 100  $\mu\text{M}$  ( $n = 12$ ). En promedio la recuperación fue completa para ambos componentes de la corriente de calcio, no hubo diferencia entre el control y lavado (Figura 12).



**Figura 10.** A. Curva IV de la corriente entrante de calcio en condiciones normales con un protocolo que parte de un  $V_h = -100$  mV ( $n=12$ ). B. Registro representativo de la condición control sobre la corriente de calcio HVA y LVA y al final la corriente de cola.



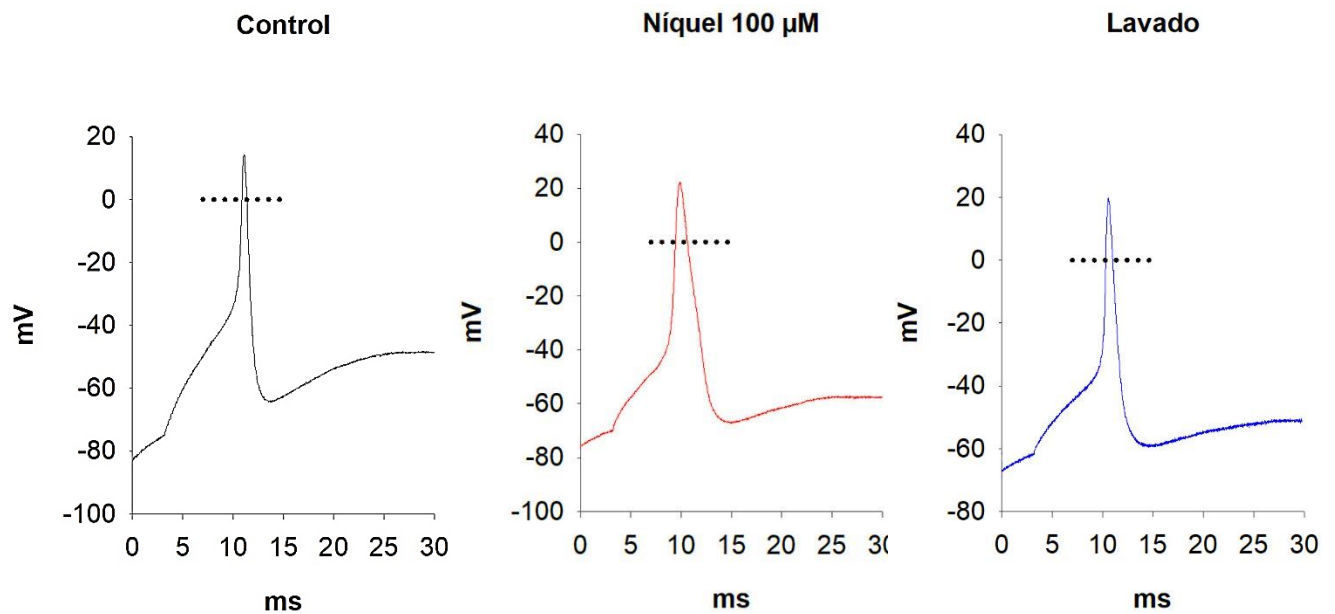
**Figura 11. A.** Curva IV de la corriente de calcio luego de la aplicación de Níquel 100  $\mu$ M con un protocolo que parte de un  $V_h$  = de -100 mV ( $n=12$ ). **B.** Registro representativo de la aplicación del fármaco sobre la corriente de calcio HVA y LVA al final la corriente de cola.



**Figura 12. A.** Curva IV de la corriente de calcio luego del lavado con un protocolo que parte de un  $V_h$  = de -100 mV. **B.** Registro representativo del lavado sobre la corriente de calcio HVA y LVA y al final la corriente de cola.

## Participación de la corriente LVA en los PA

En las NAV en condiciones de fijación de corriente y mantenidas a un potencial de membrana de alrededor de  $-80$  mV, en el registro con soluciones normales en la modalidad de célula completa se observó una fase de postdespolarización (ADP) en el potencial de acción generado con un pulso despolarizante. Esta fase de ADP fue dependiente de voltaje y pudo eliminarse parcialmente con el bloqueador de la corriente de calcio tipo T Níquel ( $100 \mu\text{M}$ ) en el PA generado con un pulso despolarizante reportada también en el PA de rebote (Rangel, 2005). Para obtener un PA con un pulso despolarizante se necesitó inyectar entre  $50$  y  $400$  pA, con un rango de amplitud de  $200$  pA a  $1$  nA de corriente en promedio en cada caso. El  $66\%$  de las NAVs que se registraron presentaron un PA de rebote ( $n = 14 / 21$ ) y sólo un  $9\%$  presentó descarga con oscilaciones ( $n = 2/21$ ) ante un pulso despolarizante aplicado de cerca de  $150$  pA.



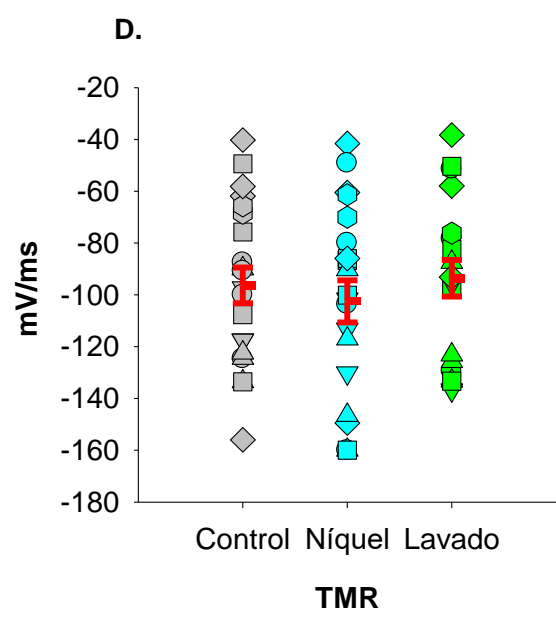
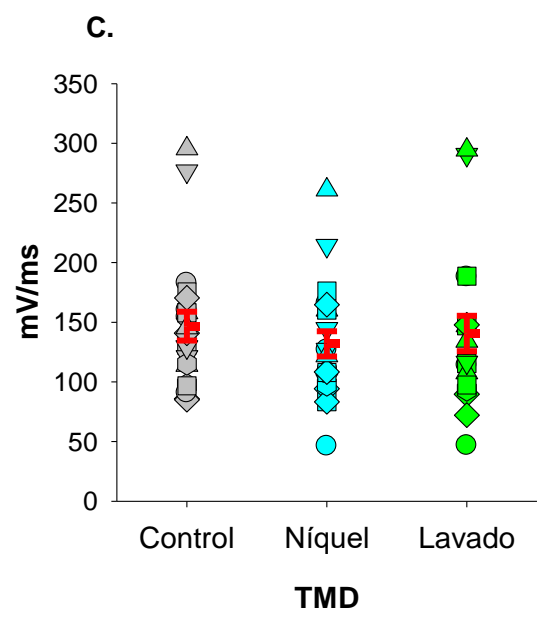
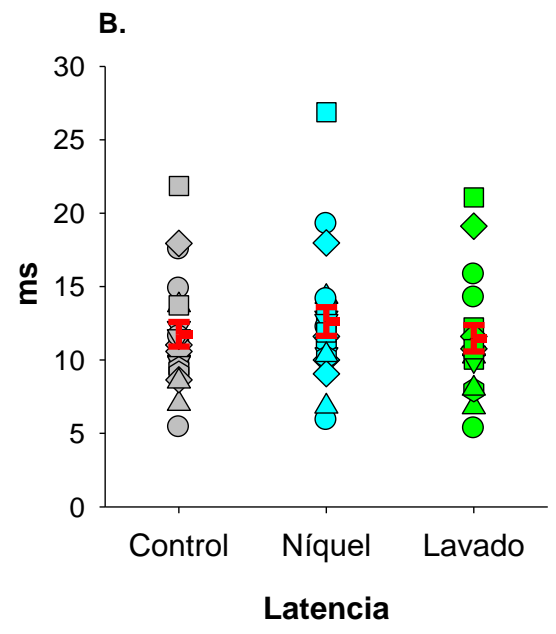
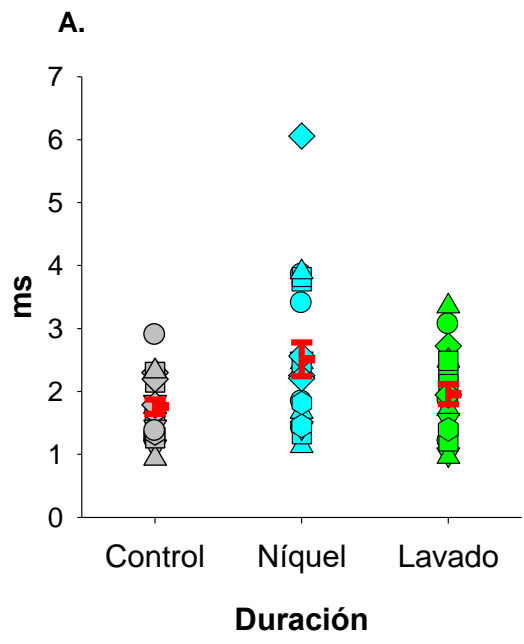
**Figura 13.** PA generado con pulso despolarizante a un  $V_m$  de alrededor de  $-75$  mV. Se muestra un registro típico del PA control. También puede notarse un aumento en la duración del PA y la latencia al pico tras la aplicación de Níquel  $100 \mu\text{M}$  y el lavado reversible. La línea punteada muestra el valor de  $0$  mV.

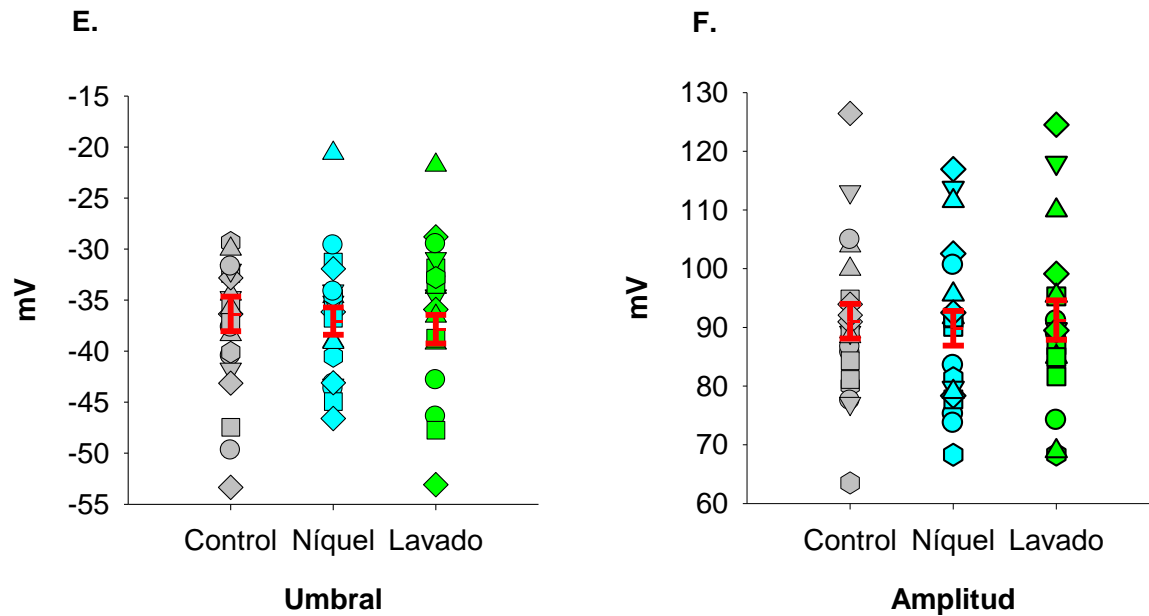


### Soluciones normales en modalidad célula completa con Níquel.

Se analizó la morfología de los PAs con pulsos despolarizantes a un voltaje de alrededor de -80 mV en la modalidad de registro de célula completa, utilizando como bloqueador al Níquel 100  $\mu$ M (Figura 13). En los PAs (n = 21) tras la aplicación del bloqueador, se observó un aumento significativo en la latencia al pico ( $p = 0.02$ , figura 14A), un aumento en la duración al 50% del PA ( $p = 0.003$ , figura 14B) y una disminución en la tasa máxima de despolarización ( $p = 0.01$ , figura 14C) (Tabla 3).

<b>Tabla 3. PAs generados con pulso despolarizante con 100 <math>\mu</math>M Níquel (n = 21)</b>							
Media $\pm$ Error estándar							
* $p < 0.05$ , ** $p < 0.01$							
	Vm (mV)	Umbral (mV)	Latencia (ms)	Amplitud (mV)	Duración (ms)	TMD (mV/ms)	TMR (mV/ms)
<b>Control</b>	-78 $\pm$ 3	-38 $\pm$ 1	12 $\pm$ 1	91 $\pm$ 3	1.7 $\pm$ 0.1	147 $\pm$ 12	-96 $\pm$ 7
<b>Níquel</b>	-80 $\pm$ 3	-37 $\pm$ 1	13 $\pm$ 1 *	90 $\pm$ 3	2.5 $\pm$ 0.2 *	132 $\pm$ 10 **	-102 $\pm$ 8
<b>Lavado</b>	-79 $\pm$ 3	-36 $\pm$ 2	11 $\pm$ 1	91 $\pm$ 3	1.9 $\pm$ 0.1	140 $\pm$ 15	-93 $\pm$ 7

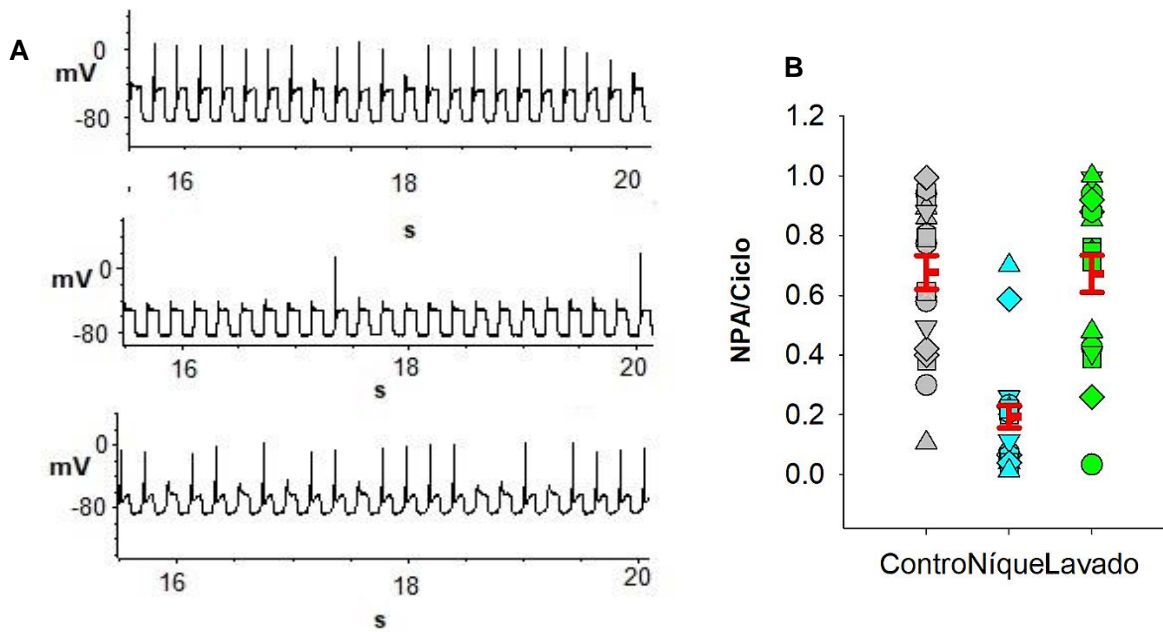




**Figura 14.** Distribución y error estándar de las características de los PA registrados (en puntos), en los que se puede apreciar las diferentes propiedades analizadas en donde la duración, la latencia y la TMD fueron las que presentaron diferencia significativa entre el control (gris) y la aplicación de  $\text{Ni}^{2+}$  a  $[100 \mu\text{M}]$  (azul) y en verde el lavado. Las marcas en rojo representan el promedio y el ES.

### Participación de la corriente LVA en la excitabilidad

Para estudiar la participación de la corriente LVA en condiciones dinámicas se usaron pulsos cuadrados despolarizantes con 150 barridos con que inyecta 1.5 veces el umbral durante 30 s. Utilizando Níquel a  $100 \mu\text{M}$  encontramos que el número de PA por ciclo disminuye significativamente, el número de PA control fue de  $101 \pm 8$  ( $n=21$ ), pasando a  $29 \pm 5$  PA ( $n=21$ ) y recupera tras el lavado a  $100 \pm 9$  PA ( $n=17$ ) en promedio ( $p < 0.001$ ). La frecuencia de estimulación utilizada fue de 5 Hz y la corriente de estimulación promedio necesaria para generar PA fue entre 50 y 300 pA (Figura 13).



**Figura 15.** Estimulación sobre las NAV. En **A**, arriba, actividad control con estimulación de pulsos cuadrados despolarizantes (5 Hz, 80 pA), en medio, luego de la aplicación de Níquel a 100  $\mu$ M, dónde se muestra una disminución en la frecuencia de disparo, abajo, después del lavado se muestra una recuperación de los PA. En **B**, histograma que muestra el número de PAs por ciclo promedio para cada una de las tres condiciones experimentales (control, Níquel 100  $\mu$ M y lavado),  $p < 0.05$ .

## DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión funcional de los  $Ca_v3$  realizando registros electrofisiológicos de las NAV. La apertura de los canales de calcio dependientes del voltaje conduce a una entrada de  $Ca^{2+}$  que resulta en un aumento neto de  $[Ca^{2+}]$  intracelular, que estaba ausente en una solución libre de  $Ca^{2+}$ , lo que indica la expresión de canales iónicos permeables al  $Ca^{2+}$  en la membrana de las NAV que fueron bloqueados por el Níquel.

Nuestros resultados apoyan firmemente la idea de que la subunidad  $Ca_v 3.2$  participa significativamente en la fisiología de las neuronas aferentes vestibulares (Autret, 2005). La alta sensibilidad a  $Ni^{2+}$  es una característica distintiva de los canales de  $Ca_v3$ .

Los canales Cav 3.1 y Cav 3.3 presentan una sensibilidad 20 veces menor a Ni<sup>2+</sup> que Cav 3.2 (Lee *et al.* 1999 *b*, Pérez-Reyes, 2003).

Con base en la IC<sub>50</sub> de Ni<sup>2+</sup> de los tres subtipos de la corriente de calcio tipo T (Cav3.1: 250 μM, Cav3.2: 12 μM, Cav3.3: 216 μM μM) (Lee *et al.*, 1999b) en este trabajo de tesis se decidió utilizar una concentración de 100 μM del bloqueador Níquel ya que (Rangel *et al.*, 2016) utiliza una concentración de 300 μM, concentración a la cual pensamos el Níquel actúa inespecíficamente sobre corrientes de calcio (pues no bloquea un tipo de corriente en particular), mientras que con la concentración elegida por nosotros se pudo obtener un estudio más de la diferenciación y caracterización de la corriente de calcio Cav<sub>3</sub>, esto firmemente relacionado con trabajo de Autret *et al.* 2005 que proponen que el subtipo Cav3.2 es la principal isoforma expresada en las NAV.

Las NAV que sólo tienen la corriente de calcio HVA se activan en promedio a -40 mV, mientras que las NAV que adicionalmente tienen la corriente LVA se activan en promedio alrededor de -60 mV. Las NAVs que sólo tienen la corriente de calcio HVA tienen una capacitancia promedio de 25.4 ± 3 pF y las neuronas que adicionalmente presentan LVA tienen una capacitancia promedio de 39 ± 15 pF (Armstrong, 1985; Limón, 2005), lo cual se relaciona estrechamente con nuestros resultados.

La conductancia de potasio sensible a 4-AP se caracteriza porque se activa en reposo y a potenciales hiperpolarizados posee un rango de corriente de ventana de -80 a -40 mV, limitando la actividad espontánea de las neuronas ya que aumenta el umbral y evita la descarga repetitiva (Risner & Holt, 2006). Por esta razón el bloqueo de estas conductancias sensibles a 4-AP es una estrategia utilizada para encontrar con mayor probabilidad resultados de descarga espontánea en las NAVs en cultivo (Soto *et al.*, 2003).

El bloqueo de las corrientes de calcio tipo T (mediante Ni<sup>2+</sup> 100μM) en la morfología del PA de las NAVs se manifiesta como un aumento en la latencia, un aumento de la duración al 50% del PA y una disminución en la tasa máximas de despolarización. Los cambios en el PA convergen hacia una disminución en la excitabilidad de las neuronas. Sin embargo, la participación de la corriente LVA en la

excitabilidad depende de la coexpresión de varios canales iónicos y su acoplamiento funcional (Vega *et. al.*, 2003; Cain & Terrance, 2013) y se presenta también en otro tipo de neuronas llegando inclusive a causar múltiples patologías crónicas (Weiss & Zamponi, 2019)

El aumento de la latencia del potencial de acción es debido a que los canales de calcio LVA participan en la fase inicial del PA, junto con la corriente de sodio, ya que los canales de calcio LVA se activan aproximadamente a -50 mV ante pequeñas despolarizaciones de membrana (Desmadryl *et. al.*, 1997; Autret *et. al.*, 2005; Limón *et. al.*, 2005). Conviene mencionar que tanto la corriente de calcio LVA como la corriente de sodio son corrientes entrantes que tienen un efecto despolarizante en la membrana. Por otro lado, en las células neuronales, los EPSP pequeños inician corrientes dependientes del voltaje que están en gran medida cerca del umbral interno (Stuart & Sakmann, 1995; Fricker & Miles, 2000). Estas corrientes internas tienden a prolongar las despolarizaciones sinápticas para que los potenciales de acción puedan iniciarse en latencias largas y variables. Por ejemplo, se ha demostrado la presencia de un retardo sináptico y la ocurrencia de potenciales postsinápticos miniatura espontáneos excitatorios (EPSPs), en el sáculo del pez dorado (Furukawa & Ishii, 1967; Ishii *et. al.*, 1971).

El efecto de la aplicación de níquel, sobre la duración al 50% en el PA se puede explicar en términos de la interacción de los canales de calcio LVA con una conductancia de potasio dependiente de calcio ( $IK_{Ca}$ ) que contribuye significativamente en la forma del potencial de acción y el patrón de descarga (Hagiwara & Kawa, 1984; Sah & Faber, 2002) para lograr el bloqueo de los canales de calcio y aumente la duración del PA (Ertel *et. al.*, 1997) lo cual podría estar relacionado con la disminución de la velocidad de conducción (Grider & Glaubenskle, 2019) que pueden determinar si hay déficits en la transmisión de potenciales de acción debido a la aplicación del fármaco. La tasa máxima de despolarización se ve afectada en el PA generado con pulsos cuadrados despolarizantes. Este resultado concuerda con lo observado por McCobb & Beam (1991), quienes describen que la mayoría de las conductancias de calcio a través de los canales de calcio tipo T ocurre durante la fase de despolarización del PA. En efecto, la

participación de la corriente de calcio en la fase de ascenso se debe a que el tiempo de inactivación de esta corriente es mayor que la inactivación de los canales de sodio (McCobb & Beam, 1991).

Otra característica notable es la capacidad de los canales de tipo T para generar picos de calcio sobre la membrana hiperpolarizante, que conduce directamente a la descarga de potenciales de acción de rebote. Esta característica es particularmente relevante en el circuito tálamocortical donde el disparo en ráfaga de los potenciales de acción está involucrado en la génesis de las descargas que ocurren en epilepsia (Kim *et al.*, 2018) lo cual sería idóneo analizar.

## CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos podemos concluir que:

Las NAV en cultivo primario presentan una corriente de calcio activada a bajos voltajes, tipo T, que al aplicar níquel a una concentración de 100 $\mu$ M reduce significativamente la corriente. Además, la corriente de calcio afectada por la aplicación de níquel produce cambios en la morfología del potencial de acción generado con pulsos despolarizantes que convergen hacia una disminución de la excitabilidad de las neuronas. Estos resultados nos sugieren que los canales de calcio tipo T participan fuertemente en el patrón de descarga de las NAV.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aidley, J. D. (1998). *The Physiology of Excitable Cells. Cambridge University Press.* 4ta Edition: 101-104.
- Armstrong, C. M. & Matteson, D. R. (1985). Two distinct populations of calcium channels in a clonal line of pituitary cells. *Science*, 227(4682): 65-67.
- Autret, L., Mechaly, I., Scamps, F., Valmier, J., Lory, P. & Desmadryl, G.J. (2005). The involvement of Cav3.2/ $\alpha$ 1H T-type calcium channels in excitability of mouse embryonic primary vestibular neurones. *J Physiol.*, 567: 67-78.

- Bartual, P. J., Perez, F. N. (1999). Anatomía y Fisiología del Sistema Vestibular Periférico. En El sistema Vestibular y sus alteraciones. *Vol. I. Barcelona: Masson*, 21-51.
- Bean, B. P. (1989). Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channels voltage dependence. *Nature*, 340: 153 –156.
- Binetti, A.C. (2015). Vestibular physiology. *Revista Faso Año 22 - Suplemento vestibular 1º parte*: 14-21.
- Borsotto, M., Barhanin, J., Fosset, M. & Lazdunski, M. (1985). The 1, 4-dihydropyridine receptor associated with the skeletal muscle voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel. Purification and subunit composition. *J. Biol. Chem.*, 260: 14255—14263.
- Brand, T. & Dieterich, M. (1999). The Vestibular Cortex: It locations, functions and disorders. Department of neurology. *Annals New York Academy of Sciences*, 293-312.
- Bronstein, A. & Lempert, Th. (1997). Essential anatomy and functions of the balance system. En: Bronstein A., Lempter Th. Dizziness .Cambridge: *Cambridge University Press*, 1-22.
- Cain, M. S. & Terrance, S. P. (2013). T-type calcium channels in burst-firing, network synchrony and epilepsy. *Biochim Biophys Acta*. 1572-1578
- Carriot, J. et al. (2014). Statistics of the vestibular input experienced during natural self-motion: implications for neural processing. *J Neuroscience*, 34(24): 8347 – 8357.
- Catterall, W. A. (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biology*. 1; 3 (8).
- Catterall, W. A., Pérez-Reyes, E., Snutch, P.T. & Striessnig, J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacol Rev.*, 57: 411-425.
- Chambard, J. M., Chabbert, C., Sans, A. & Desmadryl, G. (1999). Developmental changes in low and high voltage-activated calcium currents in acutely isolated mouse vestibular neurons. *J Physiol.*, 518: 141-149.



- Chen-Huang, C., McCrea, R. A. & Goldberg, J. M. (1997). Contributions of regularly and irregularly discharging vestibular-nerve inputs to the discharge of central vestibular neurons in the alert squirrel monkey. *Exp Brain Res.*, 114: 405-422.
- Cohen, C. J., McCarthy, R. T., Barrett, P. Q. & Rasmussen, T. (1988) Ca channels in adrenal glomerulosa cells: K<sup>+</sup> and angiotensin II increase T-type Ca channel current. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 85(7): 2412-2416.
- Corry, B. & Hool, L. (2007) Biological membrane ion channels: dynamics, structure and application. Chapter 7: Calcium channels. *Springer*, 241-299.
- Cribbs, L.L., Lee, J.H., Yang, J., Satin, J., Zhang, Y., Daud, A., Barclay, J., Williamson, M.P., Fox, M., Rees, M. & Perez-Reyes, E. (1998). Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca<sup>2+</sup> channel gene family. *Circ. Res.*, 83: 103–109.
- Cueni, L., Canepari, M., Adelman, J. P. & Lüthi, A. (2009). Ca(2+) signaling by T-type Ca(2+) channels in neurons. *Pflugers Arch.*, 457:1161-1172.
- Cullen, K. E. (2019). Vestibular processing during natural self-motion: implications for perception and action. *Nature Reviews. Neuroscience*. Department of Biomedical Engineering, Johns Hopkins University, Baltimore MD USA, 1-18.
- Desmadryl, G., Chambard, J. M., Valmier, J. & Sans, A. (1997). Multiple Voltage-dependent calcium currents in acutely isolated mouse vestibular neurons. *Neuroscience*, 78: 511-522.
- Destexhe, A., Bal, T., McCormick, D. A. & Sejnowski, T. J. (1996). Ionic mechanisms underlying synchronized oscillations and propagating waves in a model of ferret thalamic slices. *J Neurophysiology*, 76: 2049–2070.
- Dolphin, A. C. (2006). A short history of voltage-gated calcium channels. *Brit J Pharmacol.*, 147: S5-S62.
- Eatock, A. R. & Songer, E. J. (2011). Vestibular hair cells and afferents: two channels for head motion signals. *Annu Rev Neurosci.*, 34: 501-534.
- Eatock, A., Xue, J. & Kalluri, R. (2008). Ion channels in mammalian vestibular afferents may set regularity of firing. *J Exp Biol.*, 211: 1764-1774.

- Eatock, R. R. Fay, & A. N. Popper (Eds.). (2006). Vertebrate Hair Cells. *New York: Springer-Verlag*, 348–442.
- Ertel, E. A., Campbell, K. P., Harpold, M. M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T. P., Tanabe, T. & Birnbaumer, L. (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, 25: 533–535.
- Ertel, S. I., Ertel, E. A. & Clozel, J. P. (1997). “T-type Ca<sup>2+</sup> channels and pharmacological blockade: potential pathophysiological relevance”. *Cardiovascular Drugs Ther.*, 11: 723-739.
- Fatt, P. & Katz, B. (1953). The electrical properties of crustacean muscle fibres. *J. Physiol.*, 120: 171—204
- Fernández, C., Baird, R. A. & Goldberg, J. M. (1988). The Vestibular Nerve of the Chinchilla. I. Peripheral Innervation Patterns in the Horizontal and Superior Semicircular Canals. *J Neurophysiology*, 60(1): 167-181.
- Flockerzi, V., Oeken, H. J. & Hofmann, F. (1986). Purification of a functional receptor for calcium-channel blockers from rabbit skeletal-muscle microsomes. *Eur. J. Biochem.*, 161, 217—224.
- Fox, A. P., Nowycky, M. C. & Tsien, R. W. (1987). Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *J. Physiol.*, 394, 149-172.
- Fricker, D. & Miles, R. (2000). EPSP amplification and the precision of spike timing in hippocampal neurons. *Neuron*, 28: 559 - 569.
- Furukawa, T. & Ishii, Y. (1967). Neurophysiological studies on hearing in goldfish. *J. Neurophysiology*, 30: 1377-1403.
- Ganitkevich, Y. A. & Isenberg, G. (1991). Depolarization-mediated intracellular calcium transients in isolated smooth muscle cells of guinea-pig urinary bladder. *The Journal of Physiology*, 435(1), 187-205.
- Garza, A., Chávez, H., Vega, R. & Soto, E. (2005). Mecanismos celulares y moleculares de la neurotoxicidad por plomo. *Salud Mental*, 28: 48-58.
- Gil-Carcedo, L. M., Vallejo, L. A. & Carcedo, E. G. (2004). Otología. 2º Edición. Buenos Aires; Madrid. *Editorial Panamericana*, Art 59: 2-16.

- Goldberg, J. M. & Fernández, C. (1977). Conduction times and background discharge of vestibular afferents. *Brain Res.*, 122: 545-550.
- Goldberg, J. M. & Fernández, C. (1984). The vestibular system. *In: Handbook of Physiology: The Nervous System: Sensory Systems Part III*, Ed. I. Darian-Smith, Bethesda MD, 977-1022.
- Goldberg, J. M. & Holt, C. (2013). Discharge regularity in the turtle posterior crista: comparisons between experiment and theory. *J Neurophysiol.*, 110: 2830-2848
- Goldberg, J. M. (2000). Afferent Diversity and the Organization of Central Vestibular Pathways. *Exp Brain Res.*, 130: 277-297.
- Goldberg, J. M., Smith, C. E. & Fernández, C. (1984). Relation between discharge Regularity and Responses to Externally Applied Galvanic Currents in Vestibular Nerve Afferents of the Squirrel Monkey. *J Neurophysiology*, 51(6): 1236-1256.
- Goldberg, J. M., Wilson, V. J., Cullen, K. E., Angelaki, D. E., Broussard, M. D., Büttner-Ennever, A. J., Fukushima, K. & Minor, B. L. (2012). The Vestibular System: A Sixth Sense, *Oxford University Press*, 23-131.
- Goldberg, J. M., Wilson, V. J., Cullen, K. E., Angelaki, D. E., Broussard, D. M. & Buttner, Ennever, J. (2012). *Vestibular System: A Sixth Sense*. New York: *Oxford University Press*.
- Grider, H. M. & Glaubenskleee, S. C. (2019). Physiology, Action Potential. *MedicalPearls PubMed*.
- Hagiwara, N., Irisawa, H. & Kameyama, M. (1988). Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J. Physiol.*, 395: 233–253.
- Hagiwara, S. & Kawa, K. (1984). Calcium and potassium currents in spermatogenic cells dissociated from rat seminiferous tubules. *J. Physiol.*, 356: 135–149.
- Hagiwara, S., Ozawa, S. & Sand, O. (1975). Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *J. Gen. Physiol.*, 65: 617—644.
- Hitier, M., Besnard, S. & Smith, P.F. (2014). Vestibular pathways involved in cognition. *Fr Integrative Neuroscience*, Vol 8, Art 59: 2-16.

- Holt, C. J., Lysakowski, A. & Goldberg MJ. (2011). The efferent vestibular system. En: Ryugo DK, Fay RR & Popper AN: Auditory and Vestibular efferents. *Springer Handbook of Auditory Research*, 135-186.
- Honrubia, V., Hoffman, L. F., Sitko, S. & Schwartz, I. R. (1989). Anatomic and physiological correlates in the bullfrog vestibular nerve. *J Neurophysiology*, 61: 688–701.
- Ishii, Y., Ma tsuura, S. & Furukawa, T. (1971). Quantal nature of transmission at the synapse between hair cells and the eighth nerve fibers. *Jap. J. Physiol.*, 19: 79-89.
- Janssen, L. J. (1997). T-type and L-type Ca<sup>2+</sup> currents in canine bronchial smooth muscle: characterization and physiological roles. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 272(6): C1757-C1765.
- Jurkovicova-Tarabova, B., Mackova, K., Moravcikova, L., Karmazinova, M. & Lacinova, L. (2018). Role of individual S4 segments in gating of Cav3.1 T-type calcium channel by voltage. *Channels Austin (Austin)*, 12: 378–387.
- Kalluri, R., Xue, J. & Eatock. (2012). Ion Channels set spike timing regularity of mammalian vestibular afferent neurons. *J Neurophysiology*, 104: 2034-2051.
- Kandel, R. E., Schwartz, H. J. & Jessell, M. T. (2000). *Principles of Neuroscience*. a 4ta Edición McGraw-Hill, 801-816.
- Kang, H. W. *et al.* (2005). A Molecular Determinant of Nickel Inhibition in Cav 3.2 T- type Calcium Channels. *J. Biol. Chem.* 2006, 281: 4823-4830.
- Kato, T., Otsu, Y., Furune, Y. & Yamamoto, T. (1992). Different effects of L-, N- and T-type calcium channel blockers on striatal dopamine release measured by microdialysis in freely moving rats. *Neurochemistry international*, 21(1): 99-107.
- Katz, A. M. (1999). T-type calcium channels may provide a unique target for cardiovascular therapy. *Eur. Heart J.*, 1: H18—23.
- Kim, J.W., Oh, H.A., Lee, S.H., Kim, K.C., Eun, P.H., Ko, M.J., Gonzales, E.L.T., Seung, H., Kim, S., Bahn, G.H. & Shin, C.Y. (2018). T-type calcium channels are required to maintain viability of neural progenitor cells. *Biomol. Ther. (Seoul)*, 26: 439–445.

- Kostyuk, P. G., Shuba, Y. M. & Savchenko, A. N. (1988). Three types of calcium channels in the membrane of mouse sensory neurons. *Pflügers Archiv*, 411(6): 661-669.
- Lacinová, L. (2005). Voltage-dependent calcium channels. *General physiology and biophysics*, 24: 1-78.
- Lee, J.H., Daud, A.N., Cribbs, L.L., Lacerda, A.E., Pereverzev, A., Klo" ckner, U., Schneider, T. & Perez-Reyes, E. (1999). Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J. Neurosci.*, 19: 1912–1921.
- Lee, S. E., Ahn, D. S., & Lee, Y. H. (2009). Role of T-type Ca<sup>2+</sup> channels in the spontaneous phasic contraction of pregnant rat uterine smooth muscle. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 13(3): 241-249.
- Leung, A. T., Imagawa, T., Block, B., Franzini-Armstrong, C. & Campbell, K. P. (1988). Biochemical and ultrastructural characterization of the 1, 4-dihydropyridine receptor from rabbit skeletal muscle. Evidence for a 52,000 Da subunit. *J. Biol. Chem.*, 263: 994—1001.
- Limón, A., Pérez, C., Vega, R. & Soto, E. (2005). Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup>-Current Density Is Correlated With Soma Size in Rat Vestibular-Afferent Neurons in Culture. *J Neurophysiology*, 94: 3751-3761.
- Llinas, R. & Yarom Y. (1981). Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurones in vitro. Different types of voltage-dependent ionic conductances. *J. Physiol.*, 315: 549—567.
- Llinas, R. R. (1988). The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science*, 242: 1654–1664
- Llinas, R., & Yarom, Y. (1981a). Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurones in vitro. Different types of voltage-dependent ionic conductances. *J. Physiol.*, 315: 549–567.
- Llinas, R., Sugimori, M., Lin J. W. & Cherksey B. (1989). Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86: 1689—1693.

- Lu, A.T., Dai, X., Martinez-Agosto, J.A., & Cantor, R.M. (2012). Support for calcium channel gene defects in autism spectrum disorders. *Mol. Autism.*, 3-18.
- Marcotti, W. & Masetto, S. (2010). Hair Cells. In: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- McCobb, D. P. & Beam, K. G. (1991). Action potential waveform voltage-clamp commands reveal striking difference in calcium entry via low and high voltage activated calcium channels. *Neuron*, 7: 119-127.
- Monteil, A., J. Chemin, E. Bourinet, G. Mennessier, P. Lory, & J. Nargeot. 2000a. Molecular and functional properties of the human alpha(1G) subunit that forms T-type calcium channels. *J. Biol. Chem.*, 275:6090–6100.
- Nosal, O. V., Lyubanova, O. P., Naidenov, V. G. & Shuba, Y. M. (2013). Complex modulation of Cav3.1 T-type calcium channel by nickel. *Cell. Mol. Life Sci.*, 70: 1653 – 1661.
- Nowycky, M. C., Fox A. P. & Tsien R. W. (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature*, 316: 440—443.
- Oertel, D. (1997). Encoding of timing in the brain stem auditory nuclei of vertebrates. *Neuron*, 19: 959–962.
- Perez-Reyes, E. (2003). Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol. Rev.*, 83: 117–161.
- Perez-Reyes, E., Cribbs, L.L., Daud, A., Lacerda, A.E., Barclay, J., Williamson, M.P., Fox, M., Rees, M. & Lee, J.H. (1998). Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T- type calcium channel. *Nature*, 391: 896–900.
- Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., Hall, W., LaMantia, A., McNamara, J. & Williams S. (2004). *Neuroscience*. 3a Ed, Capítulo 13. Sinauer Associates Inc., 315-367.
- Randall, A. D. & Tsien, R. W. (1997). Contrasting biophysical and pharmacological properties of T-type and R-type calcium channels. *Neuropharmacology*, 36(7): 879-893.
- Rangel, M. *et.al.* (2016). Role of the Low- voltaje Activated Ca<sup>2+</sup> Current (LVA) in the Vestibular Afferent Neurons in Culture. *The FASEB Journal* 30 no.1.

- Risner, R. J. & Holt, R. J. (2006). Heterogeneous potassium conductances contribute to the diverse firing properties of postnatal mouse vestibular ganglion neurons. *J Neurophysiology*, 96: 2364-2376.
- Sah, P. & Faber E. S. (2002). Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents. *Prog Neurobiol.*, 66: 345–353.
- Sather, W. A. & McCleskey, E. W. (2003). Permeation and selectivity in calcium channels. *Annual review of physiology*, 65(1), 133-159.
- Schubert, M. C., Shepard, N. T., Jacobson, G. P. & Shepard, N. T. (2008). Practical anatomy and physiology of the vestibular system. *Balance function assessment and management*, 1-12.
- Sen, L. & Smith, T. W. (1994). T-type Ca<sup>2+</sup> channels are abnormal in genetically determined cardiomyopathic hamster hearts. *Circulation research*, 75(1), 149-155.
- Seseña, M. (2009). Modulación de la corriente de calcio por activación del receptor opioide  $\mu$  en neuronas aferentes vestibulares. Tesis de Maestría. *Instituto de Fisiología de la Universidad Autónoma de Puebla*.
- Seseña, M., Vega, R. & Soto, E. (2014). Activation of  $\mu$ -opioid receptors inhibits calcium-currents in the vestibular afferent neurons of the rat through a cAMP dependent mechanism. *Front. Cell. Neurosci.*, 8: 1-15.
- Shuba, Y. M. (2014). Models of calcium permeation through T-type channels. *Eur J Physiol.*, 466: 635-644.
- Sieber M., Nastainczyk W., Zubor V., Wernet W. & Hofmann F. (1987). The 165-kDa peptide of the purified skeletal muscle dihydropyridine receptor contains the known regulatory sites of the calcium channel. *Eur. J. Biochem.*, 167: 117—122.
- Simms, B. A. & Zamponi G. W. (2014). Neuronal Voltage-Gated Calcium Channels: Structure, Function, and Dysfunction. *Neuron*, 82: 24—45.
- Smith, M. R., Nelson, A. B. & du Lac, S. (2002). Regulation of firing response gain by calcium-dependent mechanisms in vestibular nucleus neurons. *J Neurophysiology in press*, 87(4):2031-42.

- Soto, E. & Vega, R. (1988). Actions of excitatory amino acids agonists and antagonists on the primary afferents of the vestibular system of the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Brain Res.*, 462: 104 –111.
- Soto, E. & Vega, R. (2010). Neuropharmacology of Vestibular System Disorders. *Current Neuropharmacology*, 8: 26-40.
- Soto, E., Flores, A., ErosteGUI, C. & Vega, R. (1994). Evidence for NMDA receptor in the afferent synaptic transmission of the vestibular system. *Brain Res.*, 633: 289 -296.
- Soto, E., Limón, A., Ortega, A. & Vega, R. (2002). Características morfológicas y electrofisiológicas de las neuronas del ganglio vestibular en cultivo. *Gac Méd Méx*, 138: 1-14.
- Soto, E., Limón, A., Pérez, C. & Vega, R. (2003). 4-aminopyridine removes adaptation and uncovers calcium action potentials in the vestibular afferent neurons. *Sixth IBRO World Congress of Neuroscience*, Czech Republic, 10-15.
- Splawski, I., Yoo, D.S., Stotz, S.C., Cherry, A., Clapham, D.E. & Keating, M.T. (2006). CACNA1H mutations in autism spectrum disorders. *J. Biol. Chem.*, 281: 22085–22091.
- Starr, P. A. & Sewell, W. F. (1991). Neurotransmitter release from hair cells and its blockade by glutamate-receptor antagonists. *Hear Res.*, 52: 23– 41.
- Stephens, G. J., Morris, N. P., Fyffe, R. E. & Robertson, B. (2001). The Cav2.1/α1A (P/Q-type) voltage-dependent calcium channel mediates inhibitory neurotransmission onto mouse cerebellar Purkinje cells. *European Journal of Neuroscience*, 13(10): 1902-1912.
- Storm, J. F. (1987). Action potential repolarization and fast after - hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol.*, 385: 733 -759.
- Strega, P. R. *et al.* (2005). Effect of mibefradil on sodium and calcium currents. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 289: G249 –G253.
- Stuart, G. & Sakmann, B. (1995). Amplification of EPSPs by axosomatic sodium channels in neocortical pyramidal neurons. *Neuron*, 15: 1065 - 1076
- Suarez, N. C. (2003). Morfología y función del sistema Vestibular. En: Ramírez Camacho R. Trastornos del equilibrio. Madrid: *Mc Graw- Hill Interamerica*, 3-21.



- Suzuki, S. & Rogawski, M. A. (1989). T-type calcium channels mediate the transition between tonic and phasic firing in thalamic neurons. *Neurobiology*, 86: 7228-7232.
- Takahashi, M., Seagar, M. J., Jones, J. F., Reber, B. F. & Catterall, W. A. (1987). Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84: 5478—5482.
- Talley E. M., Solorzano G., Depaulis A., Perez-Reyes E. & Bayliss D. A. (2000): Low voltage-activated calcium channel subunit expression in a genetic model of absence epilepsy in the rat. *Mol. Brain Res.*, 75: 159—165.
- Tsakiridou, E., Bertollini, L., de Curtis, M., Avanzini, G. & Pape, H. C. (1995). Selective increase in T-type calcium conductance of reticular thalamic neurons in a rat model of absence epilepsy. *Journal of Neuroscience*, 15(4), 3110-3117.
- Vega, R. & Soto, E. (2003). Opioid peptide receptors mediates an inhibitory presynaptic and excitatory postsynaptic input to the vestibular afferent neurons. *Neuroscience*, 118: 75-85.
- Vega, R., Mercado, F., Chávez, H., Limón, A., Almanza, A., Ortega, A., Perez, M. E. & Soto, E. (2003). pH modulate the vestibular afferent discharge and its response to excitatory amino acids. *NeuroReport*, 14: 1327-1328.
- Weiss, N. & Zamponi, G. W. (2019). T-type calcium channels: From molecule to therapeutic opportunities. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 108: 34-39.
- Xiong, Z. & Sperelakis, N. (1995). Regulation of L-type calcium channels of vascular smooth muscle cells. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 27(1): 75-91.
- Zhang, Y., Jiang, X., Snutch, T. P. & Tao, J. (2012). Modulation of low-voltage-activated T-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Biochim Biophys Acta*, 1828:1-10.