

Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Estudio Computacional del canal de calcio dependiente de voltaje de tipo T (CACNA1G) y su interacción con anticonvulsivos

Tesis

Que como parte de los requisitos para
obtener el Grado de

Maestro en Ciencias Químico Biológicas

Presenta

LBt. Beatriz Hernández Estrada

Dirigido por

Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas

Querétaro, Qro a julio 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Estudio Computacional del canal de calcio
dependiente de voltaje de tipo T (CACNA1G) y su
interacción con anticonvulsivos

por

Beatriz Hernández Estrada

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](#).

Clave RI: FQMAC-309155



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencias Químico Biológicas

**Estudio computacional del canal de calcio dependiente de voltaje de tipo T
(CACNA1G) y su interacción con anticonvulsivos**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

Presenta

LBt. Beatriz Hernández Estrada

Dirigido por

Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas

Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas
Presidente

Dr. Juan Francisco Cortés Benítez
Secretario

Dr. César Ibarra Alvarado
Vocal

Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera
Suplente

Dr. Alfredo Téllez Valencia
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Julio de 2023
México

DEDICATORIA

A MI FAMILIA

“LA FAMILIA NO ES ALGO IMPORTANTE, LO ES TODO.”

LOS AMO.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por el apoyo de beca de maestría (CVU: 1141200)

A la Universidad Autónomas de Querétaro por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría en el Posgrado en Ciencias Químico Biológicas de la Facultad de Química.

Al Laboratorio de Diseño Asistido por Computadora y Síntesis de Fármacos por el apoyo brindado estos dos años.

A mis sinodales la Dra. Jessica, el Dr. Cesar, el Dr. Alfredo y el Dr. Francisco por apoyarme durante mis exámenes tutorales para llevar a término este proyecto.

A mi director de tesis, el Dr. Antonio Romo Mancillas por apoyarme y enseñarme tanto durante este proceso y Dr. Giovanny Aguilera Durán, quien me apoyó incondicionalmente durante mi trayecto y que fue pieza clave para que este proyecto saliera adelante. Gracias infinitas.

A mis compañeros, Alex, Fernanda, Stephanie y Manuel quienes me alentaban y me sacaban una carcajada durante las horas de trabajo y a toda mi generación 2021-2022 con quienes compartí esta experiencia.

A mis amigas Aranza, Ámbar y Karla, quienes siempre me apoyaron y creyeron en mí en los buenos y malos momentos. Las amo, amigas. Lograremos muchas cosas y estaremos ahí para verlo y apoyarnos.

A mi pareja Adrián, por siempre apoyarme, alentarme y estar conmigo en cada paso que doy, creyendo en mis capacidades, a veces más que yo. Te amo. Gracias por tanto amor.

Gracias a la persona que fomentó la curiosidad en mí y estuvo conmigo tantos años. Gracias Fello. Sin ti no estaría aquí, ni sería quien soy el día de hoy.

Pero, sobre todo, gracias a mi familia; mi papá por siempre escucharme y quererme tanto. A pepe por apoyarme durante tantos años. A Mis abuelitos porque siempre han creído en mí y son mi motivación para seguir y ser mejor día a día. A mi mamá por sacarme adelante toda la vida y siempre estar para mí, incondicionalmente. Gracias.

ÍNDICE GENERAL

		Página
	RESUMEN	1
	ABSTRACT	3
1	INTRODUCCION	5
2	ANTECEDENTES	7
2.1	epilepsia	7
2.1.1	Tipos de crisis convulsivas	9
2.1.2	Fisiopatología de la epilepsia	11
2.2	Fármacos anticonvulsivos y antiepilépticos	14
2.2.1	Mecanismo de acción de los anticonvulsivos y antiepilépticos comerciales	17
2.3	Canales de calcio dependientes de voltaje	20
2.3.1	Tipos de canales de calcio dependientes de voltaje	22
2.3.2	Canales de calcio de tipo T	24
2.3.3	Subunidad $\alpha 1G$ del canal de calcio dependiente del voltaje tipo T (CACNA1G)	27
2.3.4	Fármacos anticonvulsivos con afinidad a CACNA1G	29
2.4	Técnicas in silico para la búsqueda y diseño de fármacos	30
2.4.1	modelado molecular	31
2.4.1.1	Modelado por homología	32
2.4.2	Acoplamiento molecular	33
2.4.3	Dinámica molecular	34
3	JUSTIFICACIÓN	35
5	HIPÓTESIS	37
6	OBJETIVOS	38
6.1	objetivos generales	38
6.2	Objetivos específicos	38
7	METODOLOGIA	39

7.1	Estructura de las proteínas y modelado por homología	39
7.1.1	Selección de ligandos	39
7.1.2	Simulaciones de dinámica molecular <i>All-Atom</i> (AA-MD) y <i>Coarse-Grained</i> (CG-MD)	40
7.1.3	Construcción de los complejos mediante enlace molecular del canal de calcio tipo T dependiente de voltaje	42
7.1.4	Relajación de los complejos ligando-proteína y cálculo de la afinidad de CACNA1G a los ligandos.	43
7.2	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
7.3	CONCLUSIONES	78
8	PERSPECTIVAS	79
9	REFERENCIAS	80
10	ANEXOS	87
	Anexo I	87
	Anexo II	90
	Anexo III	91
	Anexo IV	93
	Anexo V	94
	Anexo VI	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Fármacos comercializados actualmente divididos por generación y mecanismos de acción	21
2	Clasificación de los canales de calcio de acuerdo con su activación por voltaje y canalopatías relacionadas	29
3	Fármacos usados para el tratamiento de epilepsia dirigidos a CACNA1G	52
4	Estructuras de fármacos controles	53
5	Análisis de calidad de los modelos por homología	57
6	Análisis de calidad de los modelos quimera	57
7	Análisis de calidad de los modelos obtenidos después de CG-MD	59
8	Clústeres representativos de las dinámicas realizadas con sistemas con NaCl	61
9	Clústeres representativos de las dinámicas realizadas con sistemas con CaCl ₂	62
10	Clústeres representativos de las dinámicas realizadas con sistemas con KCl	63
11	Resultados del acoplamiento molecular	67
12	Residuos formadores del poro de CACNA1G	72
13	Valores de energía de unión de los complejos ligando-proteína	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	prevalencia mundial de epilepsia	15
2	Clasificación de las crisis epilépticas según la ILAE	17
3	Potencial de acción	12
4	Mecanismo de acción de los principales fármacos anticonvulsivos y antiepilépticos	26
5	Representación del canal del calcio dependiente de voltaje	28
6	Topología transmembrana de la subunidad $\alpha 1$ del canal de calcio tipo T	32
7	Liberación del neurotransmisor	26
8	Estructura de la subunidad $\alpha 1G$ del canal de calcio tipo T dependiente de voltaje	36
9	Mapa de calor del coeficiente de Tanimoto	54
10	Modelado de los segmentos por I-TASSER	55
11	Modelado de los segmentos por Robetta	56
12	Modelos completos de CACNA1G	58
13	Clúster 1 obtenido después de Dinámica <i>Coarse-Grained</i>	60
14	Estructuras representativas con sistema NaCl	62
15	Estructuras representativas con sistema $CaCl_2$	63
16	Estructuras representativas con sistema KCl	64
17	Análisis del poro bajo las diferentes condiciones	65
18	Representación del sitio de enlace molecular de los ligandos	68
19	Diagrama de interacción de los controles negativos	69
20	Acoplamiento molecular de CACNA1G con Z944	70
21	Acoplamientos moleculares de los ligandos seleccionados	71
22	Diagramas de interacción	72
23	Brivaracetam	73
24	Mefenitoína	74
25	Z944	75
26	Cannabidiol	76
27	Etosuximida	77
28	Metosuximida	78
29	Flunarizina	79
30	Trimetadona	80
31	Zonisamida	81
32	Levetiracetam	82

ACRÓNIMOS

SNC:	Sistema Nervioso Central
ILAE:	<i>International League Against Epilepsy</i> (Liga Internacional contra la Epilepsia).
GTC:	Tónico-Clónico Generalizadas
NMDA:	<i>N</i> -metil-D-aspartato
GABA:	Receptor del ácido γ -aminobutírico
K⁺:	Canal de iones de potasio
(SV2A):	Proteínas asociadas a las vesículas sinápticas
Cav	Canal de calcio dependiente de voltaje
CCVD	Canal de calcio dependiente de voltaje
LTS	Pico de umbral bajo por sus siglas en inglés
AMPA	Receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
PMF	Potencial de Fuerza Media
LVA	Activados por bajo voltaje
HVA	Activados por alto voltaje
AA-MD	<i>All-Atom Molecular Dynamics</i>
CG-MD	<i>Coarse-Grained Molecular Dynamics</i>
CDB	Cannabidiol
SNARE	acrónimo derivado de su nombre en inglés 'SNAP' (<i>Soluble NSF Attachment Protein</i>)

RESUMEN

La epilepsia es una alteración del sistema nervioso central, que afecta aproximadamente 70 millones de personas a nivel mundial, siendo una de las enfermedades neurológicas más frecuentes. Actualmente, existen fármacos eficaces contra la sintomatología; sin embargo, ninguno de estos fármacos actúa contra los procesos neurobiológicos que contribuyen al desarrollo de la enfermedad. Los antiepilépticos, por lo general, no presentan un mecanismo de acción único y/o no están completamente descritos. El desarrollo de convulsiones se acompaña por un incremento de las corrientes de calcio de tipo T, debido a una expresión creciente del canal de Ca^{2+} $\text{Ca}_{v3.1}$ (CACNA1G). Por otra parte, las herramientas computacionales han favorecido el uso de los estudios *in silico* para el análisis de moléculas de interés biológico, por lo cual se ha convertido en parte integral de la investigación dirigida al diseño y descubrimiento de fármacos. Debido a la escasa información sobre el mecanismo de acción de los fármacos dirigidos a CACNA1G, en este trabajo se evaluó el modo de unión, modelado por homología, acoplamiento molecular, simulaciones de dinámica molecular y metadinámicas como *umbrella sampling*. Los resultados mostraron que los aminoácidos que parecen ser más relevantes para su actividad anticonvulsiva son Asp⁹²⁴, HIS⁴⁹⁷, TRP¹⁴⁸³ y TRP¹⁴⁸⁸, observados mediante acoplamiento y dinámica molecular. Una vez realizados los acoplamientos moleculares y validar la conformación y sitio de unión se realizó un cálculo de energía de unión de los fármacos específicos como lo son: flunarizina (-98.9 kcal/mol), el levetiracetam (-91.6 kcal/mol) y el cannabidiol (-74.39 kcal/mol), zonisamida (-29.7 kcal/mol), trimetadiona (-25.5 kcal/mol), etosuximida (-9.7 kcal/mol) y metosuximida (-9.7 kcal/mol), teniendo en cuenta como control positivo a z944 (-148.38 kcal/mol) y como controles negativos brivaracetam (-17.45 kcal/mol) y mefenitoína (-17.27 kcal/mol). Con estos datos podemos observar que los que flunarizina, levetiracetam y cannabidiol si presentan buenas energías de unión

(considerando que a valores más negativos menos energía para unirse necesitan), mientras que, para el caso específico de trimetadona, zonisamida, etosuximida y metosuximida presentan baja afinidad con respecto al control, lo que podría indicar que presentan un sitio de unión diferente.

Palabras clave: epilepsia, CACNA1G, *in silico*, anticonvulsivo, energía de unión.

ABSTRACT

Epilepsy is a disorder of the central nervous system that affects approximately 70 million people worldwide and is one of the most common neurological diseases. Currently, there are effective drugs against the symptomatology; however, none of these drugs acts against the neurobiological processes that contribute to the development of the disease. Antiepileptic drugs generally do not have a unique mechanism of action and/or are not fully described. The development of seizures is accompanied by an increase in T-type calcium currents, due to an increased expression of the Ca²⁺ channel CaV3.1 (CACNA1G). On the other hand, computational tools have favored the use of *in silico* studies for the analysis of molecules of biological interest, thus becoming an integral part of research aimed at drug design and discovery. Due to the scarce information on the mechanism of action of drugs targeting CACNA1G, in this work we evaluated the binding mode, homology modeling, molecular docking, molecular dynamics simulations and metadynamics as umbrella sampling. The results showed that the amino acids that appear to be most relevant for their anticonvulsant activity are ASP⁹²⁴, HIS⁴⁹⁷, TRP¹⁴⁸³ and TRP¹⁴⁸⁸, observed by docking and molecular dynamics. Once the molecular docking was performed and the conformation and binding site were validated, a binding energy calculation was performed for the specific drugs: flunarizine (-98.9 kcal/mol), levetiracetam (-91.6 kcal/mol) and cannabidiol (-74.39 kcal/mol), zonisamide (-29.7 kcal/mol), trimethadione (-25.5 kcal/mol), ethosuximide (-9.7 kcal/mol) and metosuximide (-9.7 kcal/mol), considering as positive control z944 (148.38) and as negative controls brivaracetam (17.45) and mefenitoin (17.27). With these data we can observe that flunarizine, levetiracetam and cannabidiol do present good binding energies (considering that the more negative values the less energy needed for binding), while in the specific case of trimethadione, zonisamide, ethosuximide and methsuximide present low affinity with respect to the control, which could indicate that they present a different binding site.

Keywords: epilepsy, CACNA1G, *in silico*, anticonvulsant, binding energy.

1. INTRODUCCIÓN

La epilepsia es una alteración del sistema nervioso central, la cual se caracteriza por una predisposición duradera a generar convulsiones producidas por actividad neuronal cerebral anormal, excesiva y sincronizada; es una de las enfermedades neurológicas más frecuentes, la cual afecta cerca de 50 millones de personas en todo el mundo. En México, la prevalencia de personas con epilepsia es de 10 a 20 por cada 1,000 lo cual, sugiere que en nuestro país existen por lo menos un millón de personas con alguna forma de epilepsia (Beghi, 2020; Espinosa-Jovel, 2020; OMS, 2019).

El término "antiepiléptico" se usa para los medicamentos que tienen un efecto directo sobre el curso de la epilepsia, la probabilidad de desarrollar epilepsia o la probabilidad de desarrollar una epilepsia más grave. Por el contrario, el término "anticonvulsivo" debe utilizarse para el uso sintomático del fármaco (ILAE, 2022). Esto sucede a través de diversos mecanismos que modifican la actividad de los conductos iónicos o neurotransmisores (Yacubian, 2014). Si bien, existen fármacos eficaces contra la epilepsia, cerca del 30% de los pacientes no consiguen un tratamiento adecuado (OMS, 2019).

Entre las dianas biológicas utilizadas en el diseño de fármacos, el canal de calcio dependiente de voltaje (CCDV) presenta particular interés. Los canales de calcio activados por bajo voltaje (tipo T) están críticamente involucrados. En una crisis epiléptica existe un aumento en la expresión del canal durante la fase de la epileptogénesis y después del inicio de las convulsiones (Steinlein, 2014). Por tanto, el bloqueo farmacológico selectivo de los subtipos de canales de calcio de tipo T puede proporcionar dianas atractivas para el desarrollo de terapias antiepilépticas (Gambardella y Labate, 2014).

Actualmente, existen 13 fármacos que actúan sobre el canal de calcio, de los cuales 4 van dirigidos a CACNA1G (etosuximida, trimetadiona, metosuximida y

zonisamida). Por otro lado, en 2019, se reportaron las primeras dos estructuras obtenidas por microscopía crioelectrónica de CACNA1G humano solo y en complejo con un bloqueador selectivo Z944 en la base de datos pública *Protein Data Bank* (PDB), por lo que estas estructuras proporcionan el marco para la investigación comparativa de las distintas propiedades del canal de diferentes subfamilias de Ca_v (Zhao y col., 2019).

Considerando la escasa información con respecto al mecanismo de acción de los fármacos dirigidos al canal de calcio, las técnicas computacionales como el modelado por homología, el acoplamiento molecular y las simulaciones de dinámica molecular, pueden brindarnos información con relación a las interacciones, la afinidad y los cambios conformacionales que producen los ligandos en el canal de calcio dependiente de voltaje tipo T para comprender mejor el mecanismo antiepiléptico del bloqueo de este canal.

2. ANTECEDENTES

2.1 Epilepsia

La epilepsia es una alteración del sistema nervioso central (SNC), la cual se caracteriza por una predisposición duradera a generar convulsiones producidas por actividad neuronal anormal, excesiva y sincronizada. En condiciones normales, la actividad nerviosa se mantiene en un estado de equilibrio dinámico, regulado por procesos neuronales inhibitorios y excitatorios. Cuando existe un desequilibrio entre estos mecanismos se puede producir la epilepsia (Espinosa-Jovel, 2020). Esta enfermedad, es una de las afecciones reconocidas más antiguas del mundo, con registros escritos que se remontan al 4000 a. C. El miedo, incomprensión, discriminación y estigma social han rodeado a la epilepsia durante siglos (OMS, 2019).

Esta alteración afecta a individuos de todas las edades, sin distinción de género, con una distribución mundial (Noriega-Morales y Shkurovich-Bialik, 2020). La epilepsia es una de las enfermedades neurológicas más frecuentes, la cual afecta a cerca de 50 millones de personas en todo el mundo, principalmente en edad pediátrica (Espinosa-Jovel, 2020). Cerca del 30% de todos los pacientes, pediátricos y no pediátricos, no consiguen una buena respuesta con el tratamiento farmacológico indicado (Pulido y col., 2015). Estudios epidemiológicos indican que entre 0.5 y 1% de la población mundial padece epilepsia y se considera que entre 1 y 3% de la población tendrá epilepsia durante su vida. A nivel mundial, se estima que a cinco millones de personas se les diagnostica epilepsia cada año. En los países de ingresos altos, se estima que cada año se diagnostica epilepsia a 49 de cada 100,000 personas, mientras que, en países de ingresos bajos y medianos, esta cifra puede llegar a 139 por 100,000, por lo que el 80% de pacientes con epilepsia viven en países de ingresos bajos. Este aumento en las cifras se debe probablemente al mayor riesgo de enfermedades endémicas como la malaria o la neurocisticercosis; la mayor incidencia de traumatismos causados por el tránsito;

lesiones relacionadas con el nacimiento; y variaciones en la infraestructura médica, la disponibilidad de programas de salud preventiva y atención accesible. En México, la prevalencia de personas con epilepsia es de 10 a 20 por cada 1,000, esto sugiere que en nuestro país existen por lo menos un millón de personas con alguna forma de epilepsia (Beghi, 2020). El riesgo de muerte prematura en personas con epilepsia es hasta tres veces mayor que en la población general y existe un mayor riesgo de padecimientos psiquiátricos y comorbilidades como lo son ansiedad, depresión, problemas de aprendizaje y de memoria (OMS, 2019).

La recurrencia de crisis, así como sus consecuencias físicas y psicológicas la hacen una enfermedad desgastante y devastadora para quien la padece, así como en su entorno familiar y social (Noriega-Morales y Shkurovich-Bialik, 2020). Esta enfermedad está influenciada por el nivel de desarrollo de la sociedad, ya que tanto la incidencia como la prevalencia en los países en vías de desarrollo son más elevadas (se estima que el 75-80% de los casos de epilepsia se produce en estas zonas geográficas) (Figura 1) (Málaga et al., 2019; Beghi, 2019).

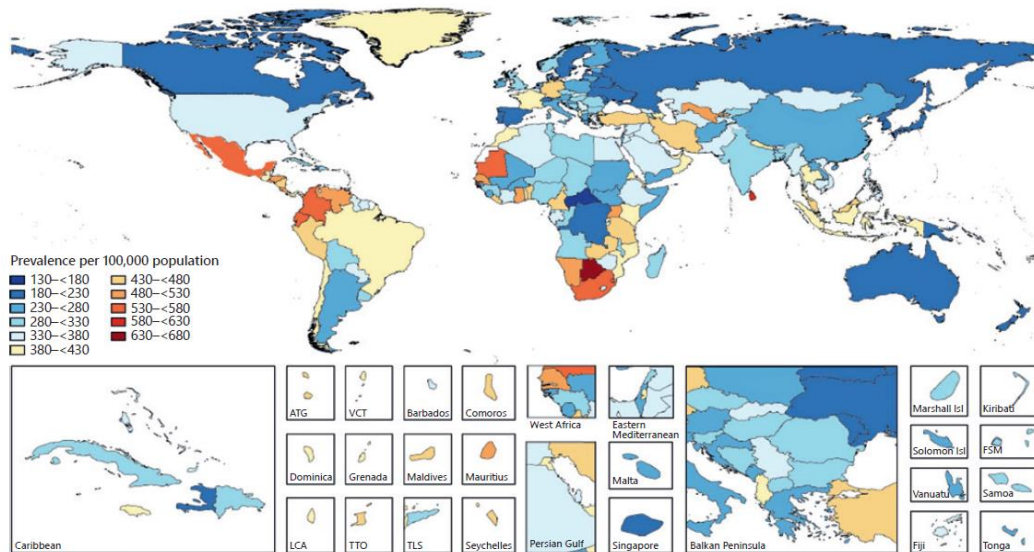


Figura 1. Prevalencia mundial de epilepsia (Beghi, 2019).

2.1.1 Tipos de crisis convulsivas

La Comisión para la Clasificación y Terminología de la Liga Internacional contra la Epilepsia (*International League Against Epilepsy*, ILAE) ha tratado de facilitar la clasificación de la epilepsia. Sin embargo, a lo largo del tiempo, ésta ha ido evolucionando, de tal manera que se tienen diversas clasificaciones (López-Meraz y col., 2009).

Actualmente, las convulsiones se dividen en tres categorías: espasmos generalizados, focales y espasmos epilépticos. Las convulsiones focales se originan en redes neuronales limitadas a una parte de un hemisferio cerebral; las generalizadas comienzan en redes neuronales distribuidas bilateralmente y, si el inicio no está claro, se denomina de inicio desconocido. Una convulsión puede comenzar de manera focal y luego generalizarse. El origen de los espasmos epilépticos es incierto, se manifiestan mediante la extensión o flexión repentina de las extremidades, que se mantiene durante varios segundos y luego se repiten (Stafstrom y Carmant, 2015).

La clasificación de las crisis comienza con la determinación de si las manifestaciones iniciales son focales o generalizadas. Las convulsiones focales se clasifican según la conciencia; preservada o alterada. Además, las convulsiones focales y generalizadas también se dividen en motoras y no motoras, según sus signos (Beghi, 2020). Los principales subtipos de convulsiones generalizadas son: ausencia, tónico-clónicas generalizadas (GTC), mioclónicas y atónicas (Figura 2). Las convulsiones de ausencia implican mirar sin responder a los estímulos verbales externos. Las convulsiones GTC consisten en < de todas las extremidades con deterioro de la conciencia. Las mioclónicas consisten en movimientos que no están asociados con cualquier alteración evidente de la conciencia. Estas breves contracciones musculares involuntarias pueden afectar a uno o varios músculos; por lo que pueden ser generalizadas o focales (Stafstrom y Carmant, 2015). Las convulsiones atónicas implican la pérdida del tono corporal. Las manifestaciones clínicas de una convulsión focal dependen del área de la corteza afectada. Cuando

la conciencia se deteriora durante una convulsión focal, la convulsión se clasifica como discognitiva. Las convulsiones están precedidas por una convulsión focal en la que el paciente conserva la conciencia y describe síntomas motores, sensoriales, autónomos o psíquicos. El origen de la tercera categoría de tipo de convulsiones, los espasmos epilépticos, es desconocida. Los espasmos epilépticos se manifiestan por extensión repentina o flexión de las extremidades, mantenida durante varios segundos (Scheffer y col., 2017).

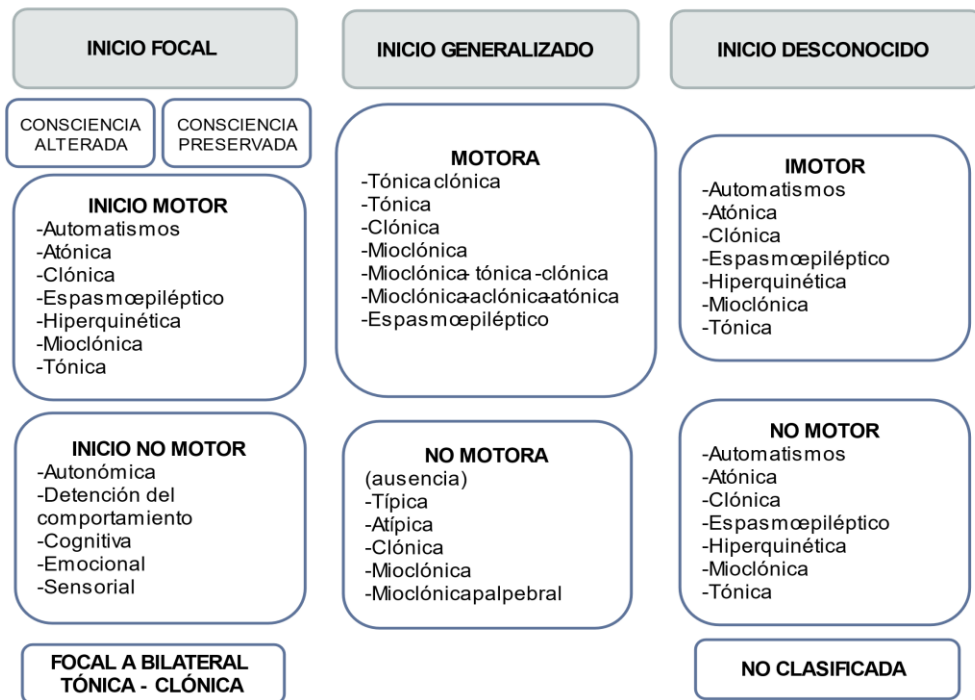


Figura 2. Clasificación de las crisis epilépticas según la ILAE. El cuadro de clasificación es columnar, pero no jerárquico, lo que significa que los niveles pueden omitirse (Adaptado de Stafstrom y Carmant, 2015).

Aproximadamente el 75 % de la epilepsia comienza durante la infancia, lo que refleja la mayor susceptibilidad del desarrollo del cerebro a convulsiones. La incidencia de crisis cerebrales es más elevada en el primer año de vida (100 casos/100,000) y va decayendo con la edad hasta una tasa aproximada de 20 casos/100,000 en la adolescencia. La prevalencia que es estimada en la población pediátrica (menores

de 16 años) a nivel global es del 0.5-0.8%, siendo mayoritariamente de origen focal (59-63%) y menos frecuentemente generalizada (12-29%) (Málaga y col., 2019). Aproximadamente el 1% de la población global padece epilepsia y aproximadamente un tercio de los pacientes tienen epilepsia refractaria, es decir, convulsiones no controladas por dos o más medicamentos antiepilépticos elegidos u otras terapias (Stafstrom y Carmant, 2015).

Una convulsión no significa epilepsia. La epilepsia se define por dos o más convulsiones no provocadas y para clasificarse como epilepsia activa debe tener un tratamiento regular con medicamentos antiepilépticos o cuando la convulsión más reciente ha ocurrido en los últimos 5 años. El estado epiléptico es una crisis epiléptica que es suficientemente prolongada o repetida a intervalos suficientemente breves para producir una condición epiléptica duradera, este estado puede tener consecuencias a largo plazo, incluida la lesión neuronal o muerte y alteración de las redes neuronales, dependiendo sobre el tipo y la duración de las convulsiones (Beghi, 2020).

2.1.2 Fisiopatología de la epilepsia

Una convulsión epiléptica es el resultado de una sincronización anormal transitoria de las neuronas en el cerebro que interrumpe los patrones normales de comunicación neuronal y da como resultado descargas eléctricas crecientes y decrecientes. Esta interrupción puede producir diversos síntomas y signos que dependen del sitio de origen de la convulsión. Se asume que las convulsiones se originan por una mayor estimulación en los mecanismos de excitación o una disminución en los mecanismos de inhibición neuronal (Moshé y col., 2015).

El potencial de acción es una despolarización transitoria, local y breve de la membrana plasmática de los axones de las neuronas, el cual permite vehicular la información nerviosa mediante su transmisión a lo largo del axón (Figura 3). El potencial de acción es el resultado de la entrada de sodio que produce una despolarización (ligada a la apertura de canales de sodio dependientes del voltaje),

seguida de una salida de potasio responsable de la repolarización (relacionada con la apertura de canales de potasio dependientes del voltaje). A su llegada al extremo del axón, el potencial de acción induce la entrada de calcio a través de los canales de calcio dependientes del voltaje que permite la liberación de neurotransmisores por movilización de las vesículas sinápticas (Estupiña, 2018).

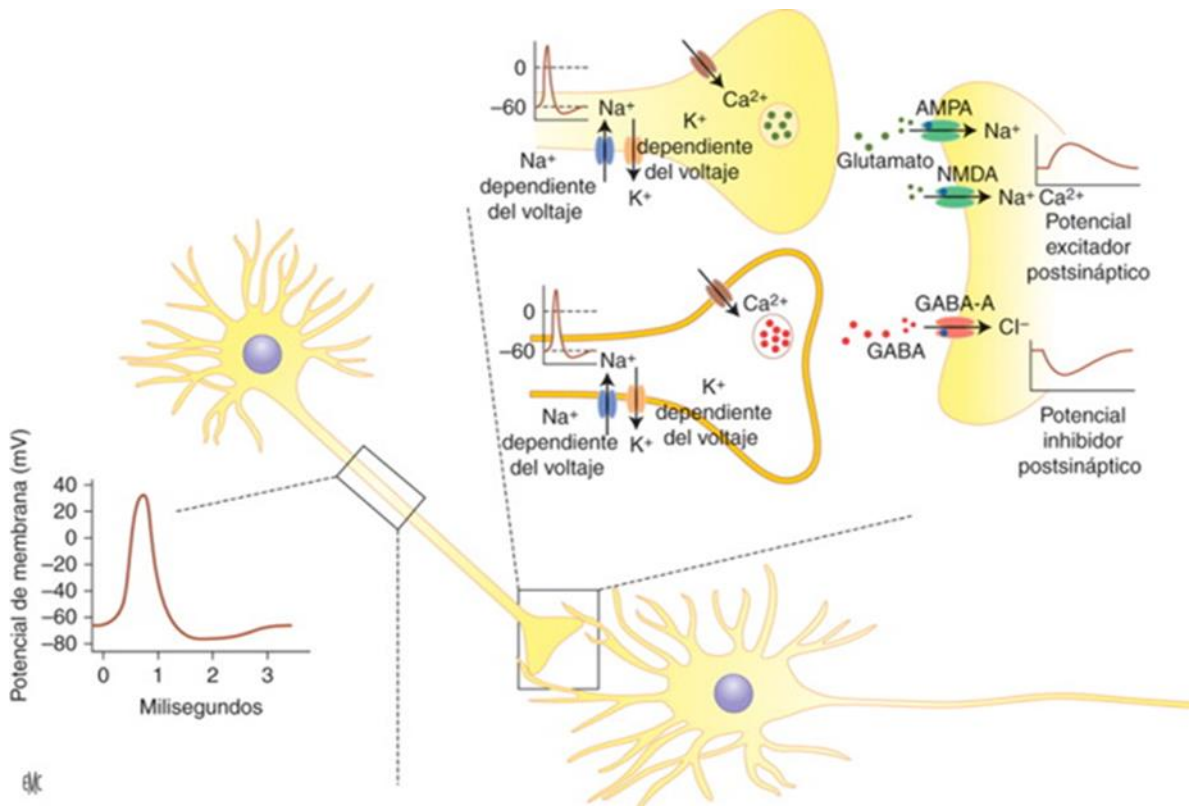


Figura 3. Potencial de acción (Estupiña, 2018).

Los canales de Na⁺ activados por voltaje inician y propagan potenciales de acción en neuronas y otras células excitables. La desregulación de los canales de Na⁺ es común en la epilepsia y las mutaciones en estos canales causan formas hereditarias de epilepsia y otros síndromes. Al igual que otros canales iónicos activados por voltaje, la dependencia del voltaje de la activación de los canales de Na⁺ se deriva del movimiento hacia afuera de las cargas de activación impulsadas por cambios en el potencial eléctrico transmembrana (Mantegazza y Catterall, 2012).

Los canales de iones de potasio (K^+) también están implicados en la epilepsia por su fisiología, genética y farmacología. Juegan un papel importante en el establecimiento del potencial de membrana en reposo negativo hacia adentro de la neurona. Algunos de estos canales exhiben la llamada “rectificación hacia adentro”, una propiedad que significa que están cerrados por despolarización de la membrana. Los canales rectificadores se cierran completamente hacia adentro, cuando la membrana se despolariza cerca del umbral del potencial de acción y se abren en los potenciales en reposo o hiperpolarizados. Esto les permite mantener la membrana hiperpolarizada, cuando está en reposo o cerca de ella, pero cuando los canales de Na^+ y de Ca^{2+} provocan una despolarización suficientemente fuerte, se vuelven inactivos. La transmisión de la información de neurona a neurona se realiza mediante la liberación de un neurotransmisor en la hendidura sináptica. La información transmitida dependerá de la naturaleza del neurotransmisor liberado: puede tener un efecto inhibitor (GABA) o excitador (acetilcolina, glutamato) (Noebels y Avoli, 2012).

En la neurona postsináptica, existen dos categorías de receptores: los receptores ionotrópicos asociados a un canal iónico, los cuales, se abrirán cuando el neurotransmisor se una a estos receptores, permitiendo la entrada de un flujo iónico y los receptores metabotrópicos, en donde la unión del neurotransmisor desencadena una vía de señalización que puede abrir o cerrar canales indirectamente (o tener algún otro efecto totalmente diferente). Entre los receptores de los canales se encuentran los receptores $GABA_A$, que son canales iónicos de cloro y producen una hiperpolarización, los receptores del glutamato de tipo ácido α -amino-3-hidroxi-5-metiloxazol-4-propiónico (AMPA) permeables al Na^+ y responsables de la excitación rápida, los receptores del glutamato de tipo *N*-metil-D-aspartato (NMDA) permeables al Na^+ y al Ca^{2+} que desencadenan una excitación más lenta. La unión del neurotransmisor al receptor dará lugar a una despolarización o una hiperpolarización del elemento postsináptico, según el tipo de flujo iónico, entonces, se liberará el neurotransmisor (Noebels y Avoli, 2012).

Los canales de calcio se abren una vez que el potencial de membrana se despolariza hasta un punto umbral, en el que el sensor de voltaje interno se mueve y la conformación del canal cambia a un estado de conducción de calcio de poro abierto. Los canales de calcio sólo conducen iones en estado abierto y con la despolarización en curso. Una vez en estado inactivado, los canales sólo pueden reabrirse mediante la repolarización a potenciales de membrana hiperpolarizados, lo que permite que el sensor de voltaje vuelva a su conformación cerrada original. Solo a partir de este estado, la despolarización adicional de la membrana puede reabrir los canales a su estado de conducción de iones. Los canales de alto umbral de activación (HVA) generan entradas de calcio más duraderas tras despolarizaciones sostenidas con canales de tipo T que conducen entradas de calcio más rápidas y cortas tanto en despolarizaciones breves como en sostenidas (Cain y Snutch, 2012; Noebels y Avoli, 2012; Manford, 2017).

2.2 Fármacos anticonvulsivos y antiepilépticos

El término "antiepiléptico" se usa para los medicamentos que tienen un efecto directo sobre el curso de la epilepsia, la probabilidad de desarrollar epilepsia o la probabilidad de desarrollar una epilepsia más grave. Por el contrario, el término "anticonvulsivo" debe utilizarse para el uso sintomático del fármaco (ILAE, 2022).

Los fármacos antiepilépticos son moléculas que actúan a diferentes niveles de la sinapsis neuronal con el fin de modificar la respuesta excitatoria y/o inhibitoria a través de diferentes mecanismos (canales de sodio o de calcio, receptores GABA, glutamato, entre otros). Los mecanismos de acción son diversos e incluso en algunos fármacos aún no están totalmente descritos (Tabla 1). Actualmente existen más de 25 fármacos que se clasifican según el año de introducción en el mercado, como fármacos de primera, segunda o tercera generación (Málaga et al., 2019).

Tabla 1. Fármacos antiepilépticos comercializados actualmente divididos por generación y mecanismos de acción (Málaga y col., 2019; Vidaurre y Herbst, 2019; Fatorre y Peruca, 2011).

GENERACIÓN	FÁRMACO	MECANISMO DE ACCIÓN
PRIMERA GENERACIÓN	Fenobarbital	Actúa sobre los receptores GABA _A e inhibe los canales de calcio.
	Fenitoína	Inhibidor del canal de sodio, potasio y del canal de calcio de tipo L.
	Pirimidona	Altera el transporte transmembrana de los canales de sodio y calcio.
	Sultiamo	Inhibidor de la anhidrasa carbónica.
	Carbamazepina	Efecto inhibitorio sobre los canales de sodio dependientes del voltaje.
	Valproato	Inhibición postsináptica mediada por GABA.
SEGUNDA GENERACIÓN	Clovazam	Actúa sobre los receptores GABA-A.
	Vigabatrina	Inhibición irreversible de la GABA-transaminasa.
	Lamotrigina	Bloquea los canales de sodio voltaje-dependiente.
	Gabapentina	Inhibidor de subunidad α -2/ δ -1 del canal de calcio dependiente del voltaje, canal de calcio de tipo N.
	Felbamato	Antagonista de receptores NMDA y efecto en canales de sodio dependientes del voltaje.
	Topiramato	Inhibidor de la subunidad α del canal de sodio dependiente de voltaje, antagonista del canal de calcio de tipo L y tipo R dependiente del voltaje.
	Tiagabina	Inhibidor selectivo de la recaptación de GABA.
	Levetiracetam	Se une a la proteína de vesícula sináptica 2A (SV2A). También inhibe los canales de calcio.
	Pregabalina	Unión a la subunidad α -2/ δ -1 de los canales de calcio dependientes de voltaje.
	Zonisamida	Inhibidor del canal de sodio y calcio dependientes de voltaje.
	Estiripentol	Efecto sobre los receptores GABA.
TERCERA GENERACIÓN	Rufinamida	Actúa sobre los canales de sodio.
	Eslicarbacepina	Inhibición de canales de sodio mediados por voltaje.
	Lacosamida	Inhibición de los canales de sodio.
	Retigabina/ezogabina	Modulación canales de potasio y receptores GABA.
	Perampanel	Antagonista de receptores AMPA-glutamato no competitivo.
	Everolimus	Inhibidor vía mTOR.

Brivaracetam	Vesículas sinápticas de la proteína 2A(SV2A).
Cannabidiol	Probable modulador del receptor GABA _A .
Etotoina	Inhibe los impulsos nerviosos en la corteza motora al reducir la afluencia de iones de sodio.
Lamotrigia	Acción sobre los canales de sodio dependientes del voltaje y la transmisión GABAérgica. Inhibidor de la Subunidad alfa-1E del canal de calcio tipo R dependiente del voltaje.
Oxcarbazepina	Bloqueo de los canales de sodio dependientes de voltaje.
Valproato	Acción sobre los canales de sodio dependientes del voltaje y la transmisión GABAérgica.
Ganaxolona	Modulador de receptores GABA _A .
Fenfluramina	Inhibidor del transportador de serotonina dependiente de sodio.
Alopregnenolona	Modula los receptores GABA _A sinápticos y extrasinápticos.
Safinamida	Inhibidor reversible de MAO-B, bloqueador de canales de sodio y modulador de canales de calcio.
Metsuximida	Se une a la subunidad α -1G del canal de calcio tipo T dependiente del voltaje.
Clonazepam	Modulador alostérico positivo de GABA _A .
Acido valproico	Inhibidor de Acil-CoA deshidrogenasa específica de cadena corta/ramificada, mitocondrial, histona desacetilasa, proteína del canal de sodio.
Etosuximida	Inhibidor de la subunidad α -1G del canal de calcio tipo T dependiente del voltaje.
Trimetadiona	Inhibidor de la subunidad α -1G del canal de calcio tipo T dependiente del voltaje.
Cannabidivarina	Efectos sobre el miembro 1 de la subfamilia V del canal catiónico de potencial transitorio (TRPV1).
Seletracetam	Modulador de Glicoproteína de vesícula sináptica 2A, bloqueador de Subunidad α -1B del canal de calcio de tipo N dependiente del voltaje.

La primera generación comprende aquellos fármacos que salieron al mercado entre 1857 y 1958 e incluye al bromuro de potasio, el fenobarbital y varias moléculas

derivadas de la estructura de los barbitúricos, tales como la fenitoína, la primidona, la trimetadiona y la etosuximida. La segunda generación comprende de 1960 a 1975 e incluye fármacos como la carbamazepina, el valproato y los benzodiazepínicos (Yacubian, 2014). Los fármacos producidos después del año 2000 se conocen como fármacos de tercera generación. Estos medicamentos pueden ofrecer nuevos mecanismos de acción y una farmacocinética favorable, minimizando efectos adversos o interacciones medicamentosas, las cuales se presentan en su mayoría en fármacos de primera generación (Vidaurre y Herbst, 2019).

Tanto en el niño como en el adulto, el tratamiento de la epilepsia se basa mayoritariamente en el uso de fármacos (ya sea monoterapia o de forma combinada), siendo el resto de las terapias (cirugía de la epilepsia, neuromodulación, dieta cetogénica) menos frecuentes. Además, la mayoría de los pacientes tratados con terapias no farmacológicas precisan del uso de fármacos de forma coadyuvante (Málaga et al., 2019)

2.2.1 Mecanismo de acción de los anticonvulsivos y antiepilépticos comerciales

Existen numerosos síndromes epilépticos y, hasta la fecha, no se ha desarrollado ningún fármaco para un síndrome o una etiología específicos. Sin embargo, existen fármacos antiepilépticos cuyo desarrollo clínico ha conducido a un uso preferente o exclusivo para un síndrome epiléptico (Yacubian, 2014).

Los medicamentos utilizados para tratar la epilepsia funcionan disminuyendo la actividad eléctrica del cerebro, ya sea previniendo la despolarización neuronal, bloqueando los canales de sodio o los canales de calcio, mejorando la función del canal de potasio, inhibiendo la excitación mediada por el neurotransmisor glutamato o promoviendo la inhibición mediada por GABA (Stafstrom y Carmant, 2015). Estos fármacos no tienen, por lo general, un mecanismo de acción único (Figura 4) (Herrera-Vázquez y col., 2016). Entre los mecanismos de acción, se encuentran efectos sobre:

- Canales de sodio dependientes de voltaje: carbamazepina, lamotrigina, oxcarbazepina, fenitoína, topiramato, lacosamida, zonisamida.
- Proteínas asociadas a las vesículas sinápticas (SV2A): levetiracetam, brivaracetam.
- Aumento de la acción del GABA mediante agonistas sobre el receptor del canal del cloro GABA_A: benzodiazepinas, fenobarbital, topiramato.
- Aumento de la acción del GABA mediante la inhibición de su degradación en la hendidura sináptica: vigabatrina.
- Aumento de la acción del GABA mediante inhibición de la recaptación sináptica: tiagabina.
- Inhibición de la liberación de neurotransmisores excitadores: lamotrigina
- Inhibición del receptor NMDA: felbamato, perampanel.
- Inhibición del receptor kainato/AMPA: lamotrigina.
- Los canales de calcio dependientes de voltaje de tipo T: etosuximida, gabapentina, pregabalina, zonisamida, trimetadiona, metosuximida.

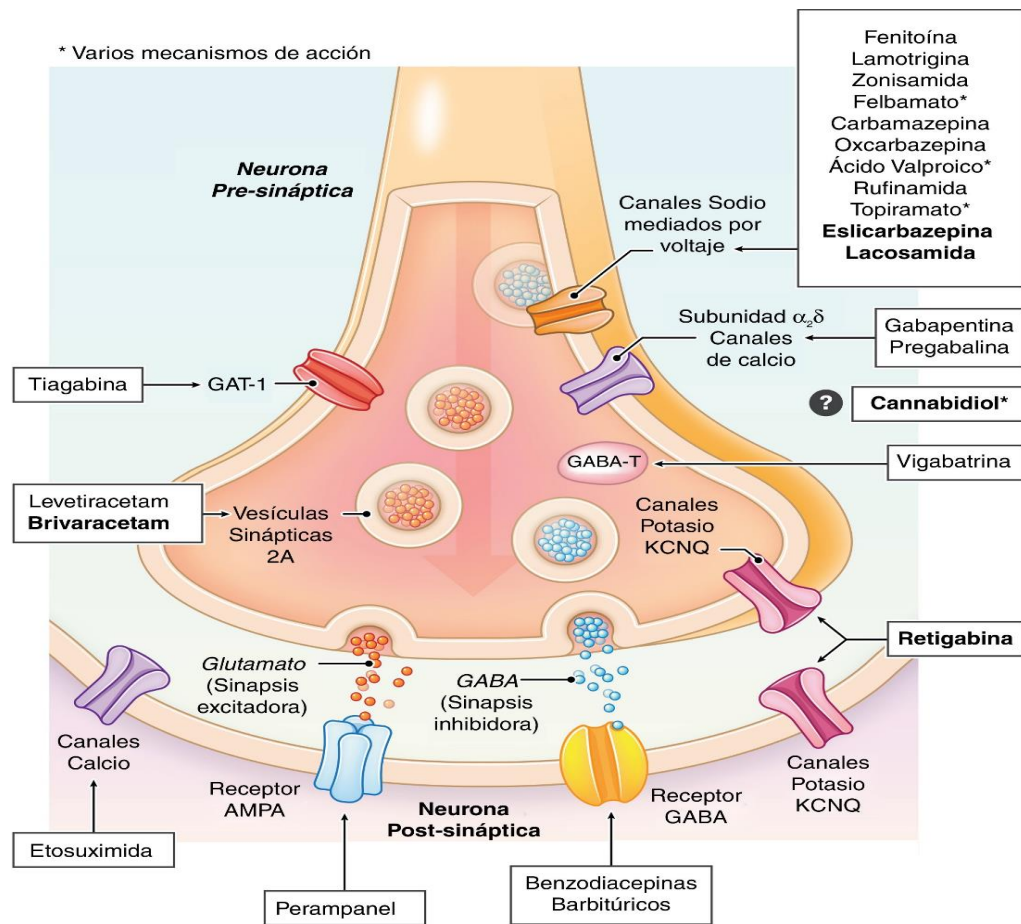


Figura 4. Mecanismo de acción de los principales fármacos anticonvulsivos y antiepilépticos (Málaga y col., 2019).

Entre las dianas farmacológicas usadas para el diseño de fármacos, el canal de calcio dependiente de voltaje (CCDV) presenta particular. Los canales de calcio activados por bajo voltaje tipo T están críticamente involucrados en el disparo de ráfagas en el circuito talamocortical. Además, se han identificado mutaciones de ganancia de función en varios genes de los canales de calcio tanto en pacientes con epilepsia como en modelos animales de epilepsia, por lo que los canales de calcio juegan un papel importante en la fisiopatología de la epilepsia. Por tanto, el bloqueo farmacológico selectivo de los subtipos de canales de calcio puede

proporcionar dianas atractivas para el desarrollo de terapias antiepilépticas (Gambardella y Labate, 2014).

2.3 Canales de calcio dependientes de voltaje

La vía más importante para la entrada de Ca^{2+} en las células excitables son los canales de calcio dependientes de voltaje. Al abrirse, permiten el flujo selectivo de iones Ca^{2+} a través del poro del canal, iniciándose una variedad de procesos intracelulares, entre los que se incluyen la secreción de neurotransmisores, la expresión génica, la modulación de la excitabilidad de la membrana, el crecimiento de neuritas, entre otros. De esta forma, los canales de Ca^{2+} constituyen el enlace fundamental entre las señales eléctricas de la superficie de la membrana y las respuestas bioquímicas intracelulares (Medel et al., 2010). El disparo por ráfagas en los circuitos talamocorticales se evoca mediante la activación de los canales de calcio activados por bajo voltaje (tipo T) y da lugar a descargas de ondas de pico asociados con la epilepsia de ausencia (Steinlein, 2014).

Los canales de Ca^{2+} pertenecen a la superfamilia de homólogos estructurales de canales dependientes de voltaje que incluye también a los canales de K^{+} y Na^{+} . Cada tipo de canal se distingue por su permeabilidad por cationes relevantes. El canal de Ca^{2+} tipo L sólo es permeable a cationes divalentes como Ca^{2+} , Sr^{2+} y Ba^{2+} . Los canales de calcio dependientes de voltaje (Figura 5) son proteínas heteroméricas que constan de tres o cuatro subunidades, transducen la actividad eléctrica en el flujo de iones Ca^{2+} que inician la liberación vesicular de neurotransmisores en las sinapsis. Todos los canales dependientes de voltaje comparten la característica de poseer cuatro subunidades, en donde, las subunidades α_2 y δ están unidas por puentes disulfuro (S-S). Cada subunidad (I-IV) está compuesta por seis segmentos hidrofóbicos transmembranales (S1-S6), donde el segmento extracelular ubicado entre S5 y S6, usualmente llamado bucle, se dobla dentro de la membrana para formar la boca del poro extracelular y la región de selectividad, mientras que los segmentos S5 y S6 forman la mayoría de los poros

en el lado intra y extracelular. La subunidad formadora de poro de los canales de calcio es la subunidad α_1 que determina las propiedades biofísicas y farmacológicas del canal. Aunque estos canales normalmente se componen de una subunidad α_1 formadora de poros y dos subunidades auxiliares G (β y $\alpha_2 \delta$), interactúan directa o indirectamente con un conjunto diverso de proteínas que regulan su función, modulación y localización dentro de la terminal presináptica (Herman y Moreno, 2005; Onetti y García, 2006; Medel y col., 2010)

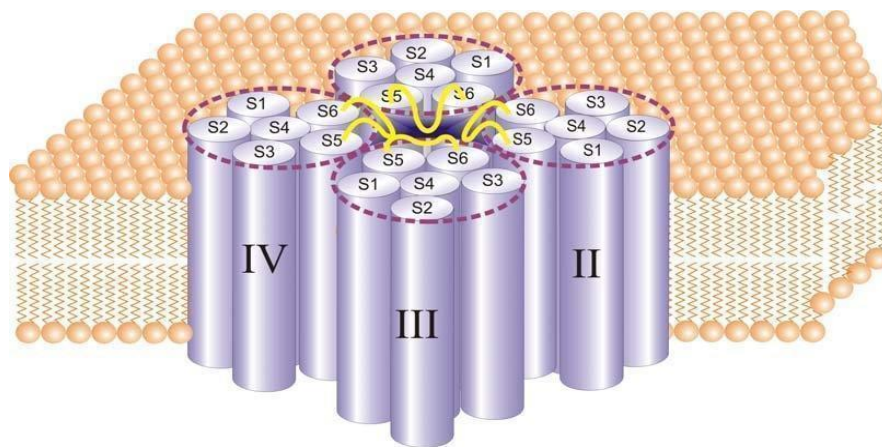


Figura 5. Representación del canal del calcio dependiente de voltaje. Los canales iónicos activados por voltaje constan de subunidades (I, II, III, IV) dispuestas alrededor de un poro central. El asa del poro (bucle) ubicado en los segmentos S5-S6 de cada dominio (en amarillo) se proyecta hacia el eje de simetría y contiene la secuencia característica del filtro de selectividad para cada tipo de canal (Onetti y García, 2006).

Los iones de calcio pueden actuar como segundos mensajeros y están involucrados en muchas vías de señalización diferentes. Pueden unirse directamente a los canales iónicos y modular su actividad o actuar indirectamente. El reclutamiento celular de iones de calcio es posible a partir de muchas fuentes, por ejemplo, por un influjo de este catión a través de canales voltaje dependientes o por su liberación del retículo endoplásmico liso, a través de canales permeables al calcio. El influjo

de calcio es parte del proceso de lesión neuronal desencadenado por glutamato que se observa después de un traumatismo cerebral o en enfermedades neurodegenerativas. La sobreactivación de los receptores NMDA por el glutamato provoca un influjo excesivo de calcio que abruma los mecanismos reguladores del calcio. Los canales de calcio de tipo T $Ca_v3.2$ controlan al receptor glutamatérgico sensible a NMDA (NMDA-R) y la subsiguiente plasticidad dependiente de NMDA-R de la transmisión mediada por el AMPA-R (receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico). Los canales $Ca_v3.2$ funcionales se incorporan principalmente en las sinapsis y puede inducir el influjo local de calcio para controlar la fuerza de transmisión de NMDA de una manera independiente a la actividad (Wang y Bochorishvili, 2015). Las vías de señalización dependientes del calcio interactúan con las neuronas de muchas maneras, por lo que los iones de calcio se consideran un factor importante en la generación de convulsiones. También se ha observado una expresión alterada de varios subtipos de canales de calcio y se han identificado mutaciones en genes de canales de calcio de pacientes con epilepsia y modelos animales de epilepsia, lo que proporciona herramientas útiles para dilucidar la participación de los canales de calcio en la fisiopatología de la enfermedad (Steinlein, 2014).

2.3.1 Tipos de canales de calcio dependientes de voltaje

Los canales de calcio generalmente se clasifican como activados por alto voltaje (HVA) o activados por bajo voltaje (LVA), dependiendo de si se abren a potenciales de membrana más positivos o negativos. Los canales activados por alto voltaje se pueden clasificar adicionalmente según sus sensibilidades farmacológicas y la composición genética de la proteína de la subunidad α_1 (Ca_v) en: tipo L (Ca_v 1.1-1.4), tipo P/Q ($Ca_v2.1$), tipo N ($Ca_v2.2$) y tipo R ($Ca_v2.3$). Los canales activados por bajo voltaje, también conocidos como "tipo T", por sus corrientes comparativamente "diminutas" o "transitorias", se clasifican además según su composición de subunidades α_1 ($Ca_v3.1$ - 3.3). Los canales de tipo R pueden exhibir características de canales "activados por voltaje medio", abriéndose en potenciales de membrana

que son más negativos que los canales HVA y más positivos que los canales LVA. Estos canales están relacionados con diferentes canalopatías (Tabla 2) (Herman y Moreno, 2005).

Tabla 2. Clasificación de los canales de calcio de acuerdo con su activación por voltaje. Estos están divididos en alto y bajo voltaje asociados a diferentes genes, los cuales están relacionados a diversas canalopatías (Singh y col., 2007).

	GEN	PROTEÍNA	TIPO DE CANAL	CANALOPATÍAS ASOCIADAS
ACTIVADOS POR ALTO VOLTAJE (HVA)	CACNA1S	Ca _v 1.1	L	Parálisis periódica hipopotasémica, hipertermia, miopatía congénita
	CACNA1C	Ca _v 1.2		Síndrome de Timothy y síndrome de Brugada.
	CACNA1D	Ca _v 1.3		Aldosterismo primario, autismo, disfunción del nódulo sinoauricular y sordera.
	CACNA1F	Ca _v 1.4		Ceguera nocturna estacionaria congénita
	CACNA1A	Ca _v 2.1	P/Q	Ataxia, migraña, encefalopatía
	CACNA1B	Ca _v 2.2	N	epiléptica y déficits motores y cognitivos.
	CACNA1E	Ca _v 2.3	R	Encefalopatía epiléptica y del desarrollo
ACTIVADOS POR BAJO VOLTAJE (LVA)	CACNA1G	Ca _v 3.1	T	Epilepsia mioclónica juvenil, ataxia cerebral, atrofia cerebelosa infantil.
	CACNA1H	Ca _v 3.2		Aldosterismo primario, desorden del espectro autista, epilepsia.
	CACNA1I	Ca _v 3.3		Esquizofrenia.

Se ha demostrado que varios de los fármacos antiepilépticos prescritos actualmente inhiben la actividad de los canales de calcio, aunque estos agentes interactúan típicamente con múltiples dianas moleculares. Dadas sus distribuciones únicas y contribuciones a las funciones cerebrales superiores, el bloqueo farmacológico selectivo de los subtipos de canales de calcio de tipo T es una estrategia atractiva para el desarrollo de tratamientos terapéuticos futuros (Steinlein, 2014).

2.3.2 Canales de calcio de tipo T

Los canales de tipo T (Ca_v3) se abren a potenciales de membrana alrededor de -70 a -50 mV, más negativo que el requerido para abrir tanto los canales de calcio típicos de HVA como los canales de sodio (~ -40 a -30 mV). La despolarización requerida para abrir los canales de tipo T desde el reposo otorga una importancia particular con respecto a la excitabilidad celular. Las pequeñas despolarizaciones, como la activación del receptor de NMDA, pueden provocar la apertura de los canales de calcio de tipo T. Esto resulta en una mayor despolarización de la membrana y, a su vez, en la apertura adicional de más canales de calcio de tipo T. Si la expresión de estos canales es de una densidad suficiente, esta despolarización en cascada induce un "pico de calcio" también conocido como "pico de umbral bajo" (LTS por sus siglas en inglés), similar a un potencial de acción, pero más lento en la tasa de activación e inactivación y con un pico de potenciales de membrana más hiperpolarizados. Este pico de calcio puede despolarizar la membrana a un nivel en el que los canales de sodio y los canales de potasio se abren e inician el potencial de acción de alta frecuencia en la cresta del LTS. La descarga del potencial de acción puede continuar hasta que los canales de calcio de tipo T se inactivan y la membrana se repolariza mediante canales de potasio activados por Ca^{2+} (Noebels y Avoli, 2012).

Todos los canales de calcio de tipo T están compuesto de la misma forma, por cuatro subunidades (I a IV), cada una con seis segmentos transmembranales (S1 a S6) más un bucle reentrante de formación de poros que permite el paso selectivo

de iones calcio. El segmento S4 en cada dominio contiene residuos de aminoácidos cargados positivamente en cada tercera posición y forma el sensor de voltaje, que permite que el canal se abra y se cierre en respuesta a los cambios de potencial de membrana. Los principales dominios transmembrana están unidos por grandes bucles citoplásmicos y los extremos NH₂-T y COOH-T también se localizan en los lados citoplásmicos. Los vertebrados expresan tres genes diferentes que codifican las subunidades α1 del canal de calcio de tipo T, denominadas α1G, α1H y α1I o, según la nomenclatura actual, Ca_v3.1, Ca_v3.2 y Ca_v3.3, respectivamente (Figura 6) (Mircea y Zamponi, 2019).

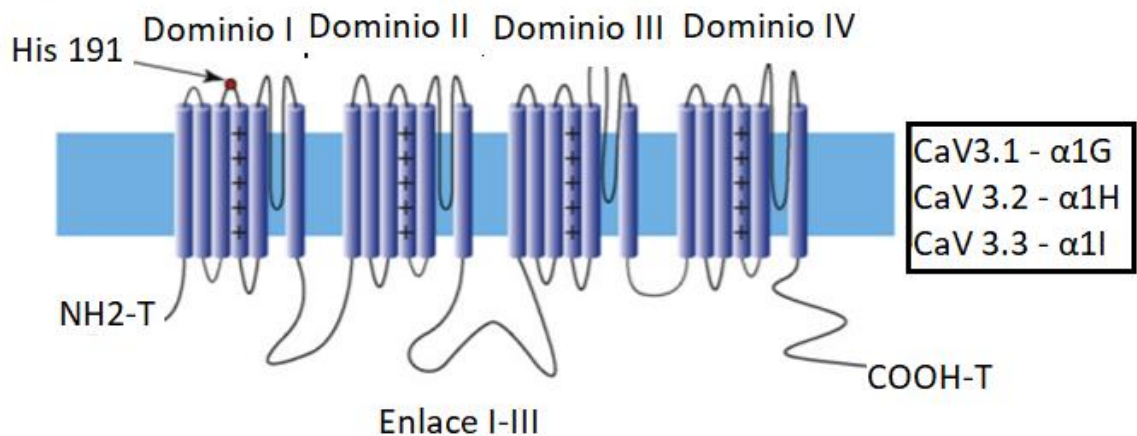


Figura 6. Topología transmembrana de la subunidad α1 del canal de calcio tipo T. El residuo His191 de Ca_v3.2 se encuentra en la región del enlazador de dominio I S3-S4. Las nomenclaturas para los tres subtipos de canales de calcio de tipo T se muestran en el recuadro (Mircea y Zamponi, 2019).

La liberación de neurotransmisores es un proceso dependiente de Ca²⁺, el cual es iniciado cuando llega un potencial de acción a la terminal presináptica, desencadenando la activación los canales de Na⁺ regulados por voltaje, permitiendo el ingreso de Na⁺ a favor de un gradiente de concentración. Posteriormente, el flujo de cargas positivas despolariza la membrana plasmática, lo que conlleva a una apertura de los CCVDs y el ingreso del ion Ca²⁺ a la neurona. A nivel citoplasmático

se activa la calmodulina por la unión de Ca^{2+} , formándose el complejo Ca^{2+} -calmodulina que activa una cascada de señalización que conduce a la liberación de los neurotransmisores, dado por la fusión de las vesículas, de acuerdo con el modelo conocido como la hipótesis SNARE, acrónimo derivado de su nombre en inglés 'SNAP (*Soluble NSF Attachment Protein*), que involucra a las proteínas sinaptotagmina, syntaxina, SNAP-25 y sinaptobrevina. La unión de Ca^{2+} a sinaptotagmina desencadena una rápida exocitosis de la vesícula sináptica, la cual esta mediada por los complejos SNARE (Lozano-Jiménez y Sánchez-Mora, 2020; Tang, J y col., 2006) (Figura 7).

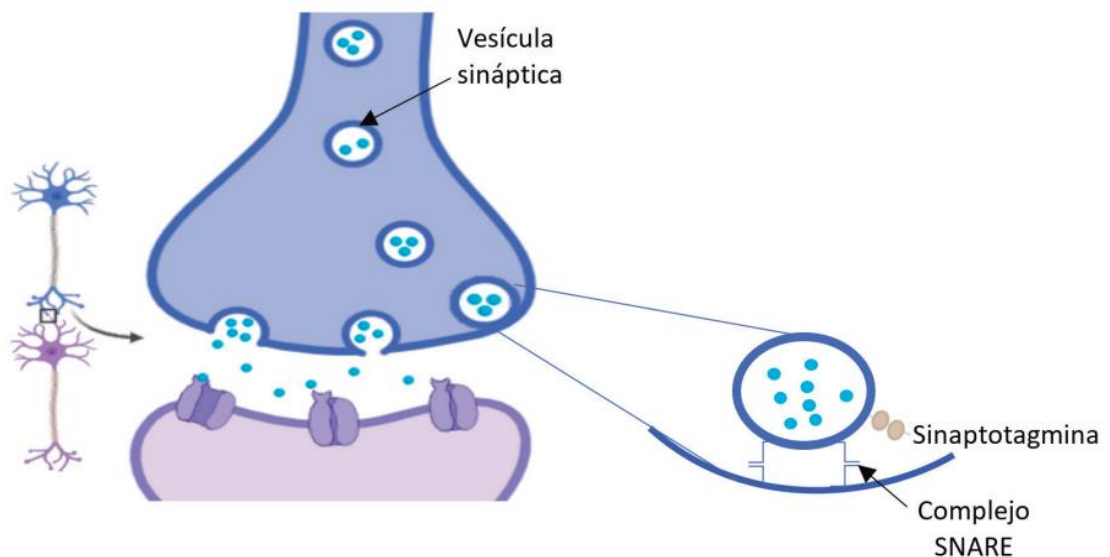


Figura 7. Liberación del neurotransmisor (Lozano-Jiménez y Sánchez-Mora, 2020).

Los canales de calcio de tipo T son de importancia crítica para regular la excitabilidad neuronal, tanto en el centro como en el sistema nervioso periférico, y son mediadores esenciales de la secreción de hormonas. Por el contrario, la hiperactividad de los canales de tipo T se ha relacionado con trastornos neurológicos como la epilepsia y dolor neuropático. Por lo tanto, es fundamental comprender los mecanismos celulares que controlan la actividad del canal de tipo

T, incluidos los medios para alterar patrones de expresión de los canales, activación de cascadas de mensajeros intracelulares que afectan directamente la actividad del canal y la regulación del empalme alternativo de los genes de canal (Mircea y Zamponi, 2019).

2.3.3 Subunidad α_1G del canal de calcio dependiente del voltaje tipo T (CACNA1G)

Los canales de calcio median el influjo de Ca^{2+} en el citosol en respuesta a los cambios en el potencial de membrana, un proceso vital que traduce señales eléctricas en la membrana a las señales químicas dentro de la célula. Los canales Ca_v3 solo comparten alrededor del 20% de identidad de secuencia y alrededor del 45% de similitud con las otras dos subfamilias; mientras que en Ca_v1 y Ca_v2 todos los miembros tienen cuatro residuos de Glu, uno en el *locus* (posición específica y fija en un cromosoma donde se encuentra un gen o marcador genético en particular) correspondiente de cada repetición, que definen la selectividad de Ca^{2+} , los *loci* correspondientes en las dos últimas repeticiones se reemplazan por Asp en los canales de Ca_v3 . Además, la caracterización de los canales expresados de forma recombinante apoya la función autónoma de las subunidades centrales de Ca_v3 , mientras que las otras familias requieren subunidades auxiliares para su inserción adecuada en la membrana, su localización y la modulación de su actividad (Zhao y col., 2019).

Los canales de calcio de tipo T se distinguen de los activados por alto voltaje, debido a su activación e inactivación a voltajes más bajos, recuperación más rápida de la inactivación y desactivación más lenta. Estas diferencias pueden proporcionar información sobre sus funciones fisiológicas. En las neuronas, los canales de tipo T producen el pico de Ca^{2+} LTS que a menudo está relacionado con una ráfaga de potenciales de acción mediados por canales de sodio activados por voltaje. También se cree que los canales de tipo T desempeñan un papel importante en el disparo por ráfaga de rebote, que se produce después de los potenciales sinápticos inhibidores. El canal humano $Ca_v3.1$ tiene las propiedades biofísicas necesarias

para participar en este fenómeno. Específicamente, se inactiva en un rango estrecho de potenciales cercanos al potencial de membrana en reposo de muchas neuronas y, a diferencia de los canales HVA, se recupera muy rápido. Tanto la dependencia del voltaje como el curso temporal de la recuperación observados con el canal clonado son muy similares a las propiedades observadas para la recuperación del pico de umbral bajo en las neuronas nativas (Chen y col., 2003).

El desarrollo de convulsiones se acompaña por un aumento de las corrientes de calcio de tipo T. Este aumento es supuestamente debido a una expresión creciente de $Ca_v3.1$ (CACNA1G) y $Ca_v3.2$ (CACNA1H) en las neuronas; estas subunidades se denominan G y H es debido al sistema de nomenclatura utilizado para los genes que codifican las subunidades de los canales de calcio dependientes de voltaje. El aumento en la expresión precede al inicio de las convulsiones, lo cual ha llevado a pensar que el canal de calcio puede facilitar la epileptogénesis mediante una alteración de dinámica de redes neuronales. La expresión del canal no solo se puede observar durante la fase de la epileptogénesis, sino también después del inicio de las convulsiones, lo cual ha demostrado que un solo episodio de estado epiléptico es suficiente para provocar un aumento duradero de la actividad del canal de calcio tipo T (Steinlein, 2014). Actualmente existen 13 fármacos que bloquean el canal de calcio, de los cuales 4 actúan en el CACNA1G (etosuximida, trimetadona, metosuximida y zonisamida).

En 2019, se reportaron las primeras dos estructuras obtenidas por microscopía crioelectrónica de $Ca_v3.1$ humano solo y en complejo con un bloqueador selectivo de Ca_v3 , 6KZO Y 6KZP en la base de datos pública *Protein Data Bank* (PDB). Sin embargo, las estructuras tridimensionales se encuentran incompletas, ya que CACNA1G consta de 2377 aminoácidos y el PDB reportado consta de 989 residuos. Aun así, las estructuras proporcionan el marco para la investigación comparativa de las distintas propiedades del canal de diferentes subfamilias de Ca_v (Figura 8) (Zhao y col., 2019)

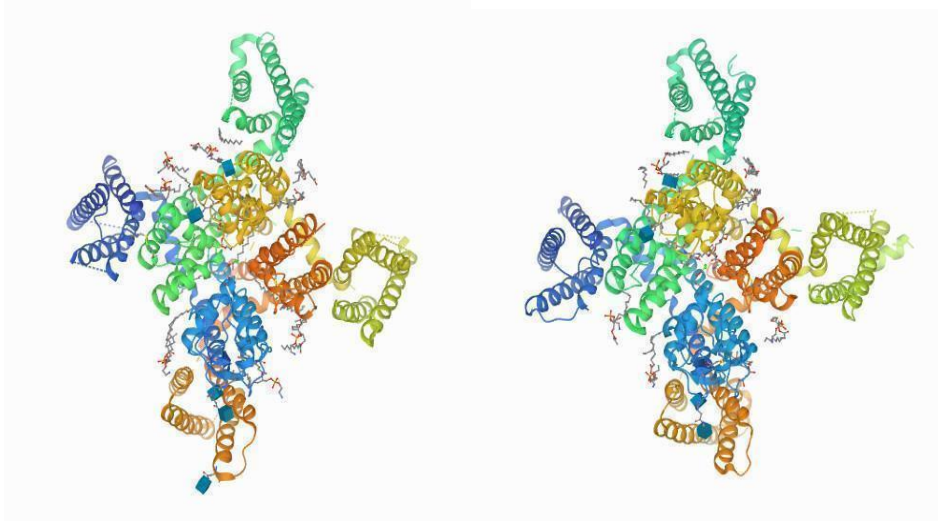


Figura 8. Estructura de la subunidad alfa-1G del canal de calcio tipo T dependiente del voltaje. Criomicroscopía electrónica 6KZO Y 6KZP, respectivamente (Zhao y col., 2019).

2.4 Técnicas *in silico* para la búsqueda y diseño de fármacos

Anteriormente, la búsqueda de nuevos compuestos con efectos terapéuticos implicaba una síntesis a través de varias rutas de los supuestos compuestos con la propiedad buscada o el cribado de productos naturales, esfuerzos que pueden ser categorizados como exploraciones aleatorias o al azar, en lugar de orientaciones racionales. En los últimos años, se han dado a conocer una serie de grandes avances en los cálculos teóricos que han favorecido el uso y la popularidad de los estudios *in silico* para el análisis de moléculas de interés biológico; ello se ha convertido en parte integral de la investigación industrial y académica dirigida al diseño y descubrimiento de fármacos (Reddy, 2007). Gracias al desarrollo tecnológico es posible realizar en menor tiempo simulaciones de procesos biológicos, cálculo de propiedades y comparar estructuras químicas de manera sistemática (Prieto-Martínez y Medina-Franco, 2019).

Las herramientas computacionales han evolucionado de tal forma que se han transformado en tecnologías cada vez más importantes para la búsqueda de

moléculas candidatas a fármacos, mediante la selección de moléculas denominadas *hit compounds* a partir de bases de datos (Velásquez y col., 2013).

2.4.1 Modelado molecular

El modelado molecular es un término general que engloba diversos métodos teóricos y técnicas computacionales para modelar, simular y predecir el comportamiento de las moléculas. Se usa para simular el comportamiento de sistemas químicos y biológicos utilizando diversos algoritmos computacionales. El objetivo de esta estrategia es reducir los gastos y tiempos de investigación. A partir de la hipótesis de que moléculas similares tienen propiedades similares, se han aplicado estrategias computacionales encaminadas a reposicionar fármacos. En función del nivel de conocimiento del problema planteado se utilizan dos estrategias, el diseño basado en ligandos y el diseño basado en la diana. El primero se aplica cuando se dispone de una serie de ligandos que poseen afinidad por la misma diana terapéutica y se unen en el mismo sitio, mientras que el segundo se utiliza cuando se dispone de la estructura tridimensional de la diana. La posibilidad de cuantificar la energía de interacción de un ligando con su diana en un ordenador ha hecho posible llevar a cabo búsquedas virtuales preliminares de millones de compuestos y, de esta manera, seleccionar aquellos que presenten mejores perspectivas para realizar ensayos biológicos con un número mucho más reducido de sustancias (Pérez, 2017). En ocasiones no hay acceso a receptores o proteínas específicas para hacer pruebas de acoplamiento. Una alternativa a esto es crear un modelo por homología de la proteína de interés. El proceso consiste en crear la estructura de una “proteína virtual”, usando como base estructuras ya conocidas y cristalizadas. Es probable que el resultado sea una “quimera” proteica, que igualmente requiere un análisis para determinar que fue construida correctamente y que sea útil para el acoplamiento molecular. Es necesario determinar que la secuencia del modelo sea válida, que su geometría sea correcta, que la estructura se mantenga estable y que el sitio activo sea capaz de reconocer al ligando (Hillisch y Pineda, 2009).

2.4.1.1 Modelado por homología

El modelado por homología, o comparativo, utiliza estructuras de proteínas determinadas experimentalmente para predecir la conformación de otra proteína que tiene una secuencia de aminoácidos similar. El método se basa en la observación de que, en la naturaleza, la conformación estructural de una proteína está conservada en mayor medida que su secuencia de aminoácidos y que los cambios pequeños o medianos en secuencia normalmente dan como resultado pequeños cambios en la estructura 3D (Hillisch y Pineda, 2009); secuencias primarias similares tendrán estructuras tridimensionales similares (Aguilera-Durán y Romo-Mancillas, 2021).

Generalmente, el proceso de modelado de homología implica cuatro pasos: asignación de pliegues, alineación de secuencia, construcción de modelos y refinamiento de modelos. El proceso de asignación de pliegues identifica proteínas con estructuras 3D conocidas (estructuras de plantilla) que están relacionadas con la secuencia de interés. Posteriormente, una base de datos de secuencias de proteínas con estructuras conocidas es buscada con la secuencia objetivo, utilizando algoritmos de búsqueda de similitud de secuencia. Tras la identificación de una correlación entre la proteína de interés y una proteína de estructura 3D conocida, las dos secuencias de proteínas se alinean para identificar la óptima correlación entre los residuos en la plantilla y las secuencias diana. La siguiente etapa en el modelado por homología es la fase de construcción del modelo. Aquí, se construye un modelo de la proteína diana a partir de la sustitución de aminoácidos en la estructura 3D de la proteína plantilla y la inserción y/o delección de aminoácidos según el alineamiento de secuencia. Finalmente, el modelo construido se comprueba con respecto a los aspectos conformacionales y se corrige o minimiza la energía, utilizando enfoques de campo de fuerza (Hillisch y Pineda, 2009). La utilidad real de un modelo por homología puede ser limitada, pero es una herramienta útil para apoyar el diseño de fármacos a dianas, cuyas estructuras tridimensionales no son bien conocidas (Prieto-Martínez y Medina-Franco, 2019).

2.4.2 Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular (conocido como *docking*) es un método que permite predecir y calcular computacionalmente la posición más favorable de la interacción entre un ligando y un blanco a partir de sus representaciones tridimensionales. **Desempeña un papel fundamental al proporcionar información sobre cómo las moléculas interactúan con sus blancos moleculares,** jugando un rol importante en el descubrimiento y desarrollo de nuevos principios activos o fármacos (Paucara y Torrez, 2019).

El acoplamiento molecular, suele emplear dos algoritmos por separado. El primer algoritmo predice todas las configuraciones o conformaciones estructurales (poses) que el ligando puede asumir dentro de un dominio o sitio activo en el blanco y el segundo algoritmo con una función de puntuación predice las energías de unión entre el ligando y el receptor para cada una de las configuraciones establecidas por el primer algoritmo. Luego, con base en la función de estos dos algoritmos, todas las configuraciones de unión del ligando y su receptor son clasificadas de acuerdo con sus energías de unión. Por tanto, las funciones de puntuación son capaces de filtrar compuestos a partir de grandes bases de datos en una búsqueda virtual, donde la configuración de un compuesto con el más alto puntaje debería corresponder a la configuración con una energía de unión más favorable, para que este compuesto pueda ser considerado como un potencial *hit* (Sharangdhar y Stephan, 2009).

Es posible hacer aproximaciones del reconocimiento e interacción molecular. El proceso se puede realizar en tres formas generales: acoplamiento rígido-rígido, rígido-flexible y covalente. El acoplamiento rígido-rígido se basa en el modelo clásico de Emil Fischer: la llave y la cerradura. En esta aproximación se asume que ligando y proteína están rígidos durante su interacción. Otro tipo de acoplamiento se deriva del modelo de ajuste inducido, considerando que la unión del ligando y la proteína se debe a una influencia directa y flexibilidad entre sí. Para modelar las interacciones, se usan campos de fuerza y las ecuaciones de Coulomb, además de

las atracciones electrostáticas y fuerzas débiles como la de Lennard-Jones y Van der Waals (Nataraj y Syed, 2017). Por tanto, lo que realiza la computadora es una serie de cálculos matemáticos que describen las interacciones entre ambas partes. La búsqueda se realiza mediante un algoritmo que genera diferentes conformaciones del ligando en forma sistemática o al azar y las empata con la proteína. Una vez identificadas las diferentes formas de organización molecular, el resultado es evaluado por una función matemática le asigna un valor teórico a cada conformación al interactuar con la proteína. Este valor de puntaje es el criterio de selección para la mejor solución (Mitsutake y Takano, 2018).

2.4.3 Dinámica molecular

La dinámica molecular es un tipo de simulación molecular computacional que permite analizar el comportamiento o evolución de un sistema (físico, químico o biológico) a través del tiempo, calculando las fuerzas entre los átomos que lo conforman mediante las ecuaciones del movimiento de Newton (Lozano-Aponte y Scior, 2014). Se utiliza para la investigación de lípidos, ácidos nucleicos y proteínas. De forma general, el enfoque de esta investigación es extraer información sobre las propiedades físicas de las proteínas (Noebels y Avoli, 2012).

Las simulaciones de dinámica molecular *all-atom* (AA-MD) representa todos los átomos de las proteínas en el sistema (cada átomo de cada residuo es considerado una esfera). Por el contrario, las simulaciones de dinámica molecular *coarse-grained* (CG-MD) considera cada residuo de la proteína como un conjunto de esferas que concentra propiedades torsionales, electrostáticas y estéricas de un conjunto de átomos, como la columna vertebral peptídica o cadenas laterales, esto aplicado a todos los residuos de las proteínas de estudio, lo que lo vuelve un cálculo más rápido; sin embargo, pierde información sobre el comportamiento de detalles estructurales finos (Aguilera-Durán, 2021)

Por medio de la dinámica molecular, se pueden calcular diferentes propiedades fisicoquímicas del sistema como la energía libre, entropía, solubilidad, viscosidad,

presión, temperaturas de cambio de fase y, en sistemas biológicos, permite medir la fuerza de interacción entre posibles fármacos y sus dianas biomoleculares o receptores, e incluso describir el comportamiento de una proteína y moléculas complejas bajo ciertas condiciones, por mencionar algunas de sus capacidades. Si bien, las ecuaciones del movimiento no describen el sistema a nivel cuántico (lo cual requeriría una capacidad de cálculo extremadamente grande), este tipo de estudios han mostrado buena correlación con resultados experimentales, y se pueden realizar con equipos de cómputo ciertamente convencionales, pero que cumplan ciertas especificaciones (Lozano-Aponte y Scior, 2014).

El cálculo de las diferencias de energía libre es uno de los principales desafíos en biología computacional y bioquímica. Las simulaciones de tipo *umbrella sampling*, un método de dinámica molecular sesgada (*Steered molecular dynamics*), es uno de los métodos que proporciona energía libre a lo largo de una coordenada de reacción (Kästner, 2011). Se ha desarrollado una forma para utilizar el método de *umbrella* para calcular el potencial de la fuerza media utilizando la dinámica molecular. Durante una simulación, el potencial *umbrella* mejora periódicamente, teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos anteriormente. Las ventajas que presenta sobre otros métodos son que se necesita una cantidad relativamente pequeña de intervención manual y que un resultado intermedio después de un pequeño tiempo de simulación ya es una estimación completa, aunque burda, del potencial de la fuerza de unión. También se proporciona un método robusto para estimar el error en las diferencias de energía obtenidas entre conformaciones y en los parámetros del potencial de fuerza media (PMF) (Hoofst y Eijck, 1998).

Utilizando estas herramientas *in silico* podremos investigar las interacciones, afinidad y cambios conformacionales de los ligandos del canal de calcio de tipo T (CACNA1G), lo que permitirá recabar información útil para el futuro diseño de nuevas moléculas con potencial farmacológico para el tratamiento de la epilepsia y ampliar el espectro de fármacos de los pacientes con esta enfermedad para mejorar su calidad de vida.

3. JUSTIFICACIÓN

La epilepsia es una alteración del sistema nervioso central, la cual es caracterizada por una predisposición duradera a generar convulsiones producidas por actividad neuronal cerebral anormal, excesiva y sincronizada. Se estima que aproximadamente 70 millones de personas en todo el mundo padecen epilepsia, de la cual, la mitad son niños. Esta alteración afecta a la calidad de vida de los pacientes y sus familias y genera un impacto significativo tanto a nivel social como económico en los sistemas de salud, donde hasta en el 30 % de los pacientes no se consigue una buena respuesta con el tratamiento farmacológico indicado. El tratamiento de la epilepsia se basa mayoritariamente en el uso de fármacos, siendo el resto de las terapias menos frecuentes. Actualmente, existen más de 25 fármacos funcionales contra la sintomatología que constituyen las crisis epilépticas, aunque ninguno de estos fármacos actúa contra los procesos neurobiológicos cerebrales que contribuyen a la epilepsia. Los antiepilépticos no tienen, por lo general, un mecanismo de acción único. En la mayoría de los fármacos utilizados, no se conocen completamente los mecanismos exactos.

El desarrollo de convulsiones se acompaña por un aumento de las corrientes de calcio de tipo T. Este aumento es supuestamente debido a una expresión creciente de $Ca_v3.1$ (CACNA1G), por lo que representa una diana farmacológica de interés. En 2019 se obtuvo la primera criomicroscopía de CACNA1G, sin embargo, la estructura tridimensional reporta residuos faltantes. Aun así, proporciona una herramienta útil para dilucidar la participación de los canales de calcio en la fisiopatología de la enfermedad. El bloqueo farmacológico selectivo de los subtipos de canales de calcio de tipo T puede proporcionar objetivos atractivos para el desarrollo de tratamientos terapéuticos futuros.

Debido a la escasa información respecto a la interacción molecular de los canales de calcio con sus ligandos y con ayuda de la cristalografía incompleta reportada recientemente, las herramientas computacionales como el modelado por

homología, acoplamiento molecular (*docking*) y simulaciones de dinámica molecular, permitirán comprender el sitio y modo de unión de los fármacos con CACNA1G. La descripción de estos fenómenos en los canales de calcio permitirá generar información relevante para el desarrollo de nuevas moléculas con potencial farmacológico para el tratamiento de epilepsia, considerando las interacciones, afinidad y cambios conformacionales derivados de la interacción con los ligandos reportados en bibliografía.

4. HIPÓTESIS

El canal de calcio dependiente de voltaje tipo T presenta aminoácidos específicos que favorecen la unión de ligandos para efectuar el cierre o la apertura de estos canales, mediante cambios conformacionales observables por modelado molecular.

5. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Evaluar las interacciones moleculares del canal de calcio dependiente de voltaje tipo T con diferentes fármacos anticonvulsivos por medio de técnicas de modelado molecular.

Objetivos específicos

- Construir por modelado por homología la estructura de la subunidad alfa del canal de calcio dependiente de voltaje tipo T basado en las criomicroscopías 6KZO y 6KZP.
- Calcular y describir la interacción en forma y modo de unión de ligandos selectos con el canal de calcio dependiente de voltaje de tipo T (CACNA1G) por acoplamiento molecular y simulaciones de dinámica molecular.
- Proponer un modelo de interacción general de ligando-proteína que defina los requisitos estructurales ideales, para la posible manifestación anticonvulsiva sobre el canal de calcio dependiente de voltaje de tipo T.

6. METODOLOGÍA

7.1 Estructura de las proteínas y modelado por homología

La secuencia de aminoácidos de CACNA1G para el modelado por homología se obtuvo de la base de datos *UniProt* (ID: 043497) (The Uniprot Consortium, 2021). El modelado se realizó dividiendo la proteína en segmentos y se mandó a modelar en los servidores públicos I-TASSER (*Iterative Threading ASSEmbly Refinement*) (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/> fecha de acceso 14/11/21) (Yang y Zhang, 2015), Robetta (<https://rosetta.bakerlab.org/> fecha de acceso 11/11/21) (Song y col., 2013) y *Swissmodel* (<https://swissmodel.expasy.org/> fecha de acceso 10/11/21) (Waterhouse y col., 2018). Posteriormente, para la selección del mejor modelo construido nos basamos en los parámetros de *c-score*, *z-score* y los residuos favorecidos en el diagrama de Ramachandran, obtenidos de un análisis de calidad de los modelos. El análisis de calidad se realizó en el servidor público MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>) (Chen y col., 2010). Para modelar la proteína, se utilizó como plantilla la estructura reportada de este canal con código PDB: 6KZO, el cual se encuentra en un estado abierto sin ligandos (Zhao y col., 2019).

7.1.1 Selección de ligandos.

Los ligandos que utilizamos fueron seleccionados acorde a su capacidad para interactuar con CACNA1G, realizando una búsqueda bibliográfica en DrugBank (Wishart et al., 2006) y PubChem (Kim y col., 2021); como controles negativos se seleccionaron aquellos fármacos anticonvulsivos que se encuentran en el mercado y que no presentaran interacción con CACNA1G. Las estructuras fueron descargadas del servidor PubChem y se les realizó un *preprocess* en Schrödinger Maestro 2021-4 (Schrödinger, 2021).

7.1.2 Simulaciones de dinámica molecular *All-Atom* (AA-MD) y *Coarse-Grained* (CG-MD) para la relajación del modelo.

Los sistemas para las dinámicas se construyeron en CHARM-GUI (Jo y col., 2008), usando el módulo *Bilayer builder*, este servidor web es útil para facilitar la construcción de sistemas de dinámica molecular. Se agregaron las modificaciones postraduccionales correspondientes, reportadas en UniProt. Se utilizó un ensamble isotérmico-isobárico (NPT) a 1 atm de presión y 310.15 K, empleando un acoplamiento de temperatura y cambios de escala de velocidad en un término estocástico y un baróstato de tipo Parrinello-Rahman (Parrinello y Rahman, 1981). Para las moléculas de agua se utilizó un modelo de tres puntos (TIP3P), para las membranas lipídicas se utilizó fosfatidilcolina (POPC).

El tamaño del sistema con NaCl fue de 16.203X16.153X15.497 nm, con un volumen de 3578.54 nm³, 478 lípidos POPC (relación de capas superior/inferior 238/240), 78,018 PW, 247 *beads* de Na⁺ y 212 *beads* de Cl⁻. El tamaño del sistema con CaCl₂ fue de 16.135X16.286X15.498 nm, con un volumen de 3599.6 nm³, 482 lípidos POPC (relación capas superior/ inferior 240/242), 78,221 PW, 232 *beads* Ca²⁺, y 429 *beads* Cl⁻ y el tamaño del sistema con KCl fue de 16.123X16.090X15.544 nm, con un volumen de 3544.32 nm³, 473 lípidos POPC (relación capas superior/inferior 233/240), 76,782 PW, 245 *beads* K⁺, y 210 *beads* Cl⁻. Todas las dinámicas moleculares de minimización se realizaron por triplicado

Una vez obtenido el sistema, se realizó una simulación de tipo CG-MD de 1000 ns para relajar el modelo de CACNA1G. Para el caso de las CG-MD, los sistemas se construyeron en el módulo *Martini Maker* de CHARMM-GUI (Qi y col., 2015), utilizando el campo de fuerza Martini22p y eldenynp22 en un ensamble NPT a 1 atm de presión y 310.15 K de temperatura; se adicionó una membrana de POPC, utilizando un modelo de agua polarizable (PW) y se agregaron los iones correspondientes para neutralizar el sistema (NaCl, 0.15 M). Los sistemas se

sometieron a los pasos de equilibrio y minimización recomendados por el servidor, similares a los necesarios en las AA-MD, previo al paso de producción.

Para los sistemas para las AA-MD, los sistemas se construyeron en el módulo *Bilayer builder* del apartado *Membrane builder* de CHARMM-GUI, el cuál es un servidor para construir sistemas complejos y prepararlos para simulación (Jo y col., 2008; Lee y col., 2016). Se adicionaron los iones correspondientes; con la finalidad de evaluar si existían cambios conformacionales relacionados con los iones en el sistema, se construyeron sistemas con diferentes iones, un sistema con NaCl, otro con KCl y otro con CaCl₂. Estas dinámicas fueron de 200 ns. Todas las AA-MD de minimización se realizaron por triplicado.

Las simulaciones de dinámica molecular fueron realizadas en el programa Gromacs 2021.7, (Berendsen y col., 1995). Los sistemas se sometieron a 5000 pasos de minimización de manera descendente, seguido de 6 pasos de equilibrio, reduciendo constantes de fuerza en un esquema sugerido por el servidor CHARMM-GUI, previo a las simulaciones de producción. Los módulos “RMSD”, “RMSF” y “*cluster*” de Gromacs se usaron para obtener los datos de análisis en las dinámicas, mientras que para encontrar las conformaciones más relevantes se utilizó el algoritmo “gromos”. En todos los sistemas se usó el campo de fuerza CHARMM36 (Daura, et al., 1999).

Utilizado cada conformación obtenida de cada sistema se realizó un análisis global y se evaluó el RMSD tanto de la proteína completa como del poro, para verificar que el tiempo de simulación fuera el adecuado esperando nuestro sistema se haya estabilizado. Posteriormente, se unieron las trayectorias para poder seleccionar el clúster representativo realizando un Análisis de Componentes Principales (PCA) de cada sistema (Greenacre. et al., 2022).

Para el análisis del volumen del poro con los diferentes sistemas, se extrajeron *frames* de los archivos de trayectoria de producción cada 25 ns utilizando VMD (Humphrey, et al., 1996) y se guardaron como un único archivo PDB. Los cálculos

del volumen del poro se calcularon utilizando el script POVME3.0 Python (Wagner, et al., 2017) con una esfera de puntos de 8.2 Å de radio, con las coordenadas de (74.05, 80.26, 66.10), como x, y y z, respectivamente, las cuales refieren a el sitio del poro. El espaciado de cuadrícula se estableció en 1.0 Å, mientras que el límite de distancia fue de 1.09 Å. Se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk (Royston, 1992) utilizando un nivel de significancia de $\alpha=0.05$. Posteriormente, se realizó un análisis estadístico utilizando la prueba de Krustal-Wallis (McKight y Najab, 2018) y comparaciones por pares utilizando la prueba Wilcoxon (Cuzick, 1985) para determinar si había un efecto significativo entre las simulaciones con iones diferentes.

7.2 Construcción de los complejos mediante acoplamiento molecular del canal de calcio tipo T dependiente de voltaje con los ligandos seleccionados.

Utilizando la conformación más representativa obtenida de cada sistema simulado (KCl, NaCl y CaCl₂), del clúster más numeroso de la simulación, se realizó un acoplamiento molecular de los ligandos seleccionados, previamente optimizados utilizando el campo de fuerza OPLS-2005 en el programa Schrödinger Maestro 2021-4 (Schrödinger, 2021). Posteriormente, se identificaron los enlaces rotables y se asignaron cargas atómicas tipo Gasteiger-Marsilli con el programa MGL-Tools 1.5.7.

Se ha reportado que el canal de CACNA1G presenta residuos relevantes para la unión de los ligandos dirigidos a CACNA1G. Estos residuos (Glu³⁵⁴, Phe⁹¹⁷, Leu⁹²⁰, Gln⁹²², Gly⁹⁵¹, Asn⁹⁵², Phe⁹⁵⁶, Lys¹⁴⁶², Asp¹⁴⁶³, Val¹⁵⁰⁵, Thr¹⁷⁷⁷) (Caknak, y col. 2022), se utilizaron para obtener las coordenadas del *GridBox*, con un tamaño de 60 x 60 x 60 npts, el cual se calculó en AutoGrid 4.2.6 (Morris, et al., 2009). Las coordenadas obtenidas para posicionar el *grid* fueron X: 73.06, Y: 73.76 y Z: 74.35.

El acoplamiento molecular de CACNA1G con los ligandos seleccionados se llevó a cabo con AutoDock-GPU 1.5.3, utilizando los algoritmos ADADELTA y Solis-Wets como métodos de búsqueda conformacional, con 100 corridas y un máximo de

1×10^8 de evaluaciones (Santos-Martins y col., 2021). Los acoplamientos moleculares se realizaron por triplicado. La conformación representativa de los acoplamientos se eligió mediante el matriz de covarianza de RMSD y su agrupamiento realizado en Rstudio.

7.3 Relajación de los complejos ligando-proteína y cálculo de la afinidad teórica de CACNA1G a los ligandos.

Se construyeron los sistemas para la simulación de dinámica molecular de tipo AA-MD, bajo las condiciones previamente mencionadas. Las simulaciones de dinámica molecular fueron de 100 ns, utilizando el campo de fuerza CHARMM36, siguiendo los pasos de minimización y equilibrio sugeridas por el servidor CHARMM-GUI en un ensamble isotérmico-isobárico (NPT) a 310.15 K y 1 atm, utilizando moléculas de agua TIP3 y los iones necesarios (0.15 M NaCl) y una membrana de POPC; las simulaciones se realizaron en el programa Gromacs.

Utilizando la conformación más representativa del clúster más numeroso de cada simulación, se construyó el sistema según los pasos antes mencionados, para realizar una simulación de dinámica molecular de tipo *umbrella sampling* y calcular la energía de unión (ΔG), utilizando como variable colectiva la distancia entre el centro de masa del ligando y la proteína. *Umbrella sampling* es un proceso de dinámica molecular, en el que se puede cambiar una variable de forma predeterminada. La variable de cambio fue el aumento de la distancia entre los centros de masa de la proteína y los ligandos en el eje z a una velocidad de 0.06 nm/ns y con una fuerza de 1000 kJ/mol·nm².

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Selección de fármacos anticonvulsivos con afinidad a CACNA1G

Se realizó una búsqueda bibliográfica de los fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento de la epilepsia, asociados a CACNA1G. Estos fármacos pueden ser directamente para su tratamiento o que actúen como coadyuvantes. Existen cuatro anticonvulsivos que tienen efecto en CACNA1G y diferentes medicamentos que se usan como coadyuvantes para el tratamiento de la epilepsia (Tabla 3), entre los que encontramos que actúan directamente con CACNA1G se encuentra metosuximida y etosuximida, los cuales son anticonvulsivos comúnmente usados para tratar crisis de ausencia, reduciendo la frecuencia de los ataques, aparentemente por depresión de la corteza motora y elevación del umbral del sistema nervioso central a los estímulos convulsivos (Wright y col., 1995; Besag y col., 2000). La trimetadiona, la cual actúa sobre el sistema nervioso central reduciendo las convulsiones, a través de la inhibición de los canales de calcio de tipo T dependientes de voltaje (Shen y col., 2007). El cannabidiol (CBD) es un cannabinoide activo que se utiliza como tratamiento complementario para el tratamiento de las convulsiones; se ha mostrado efecto como anticonvulsivo, actuando sobre las reservas de Ca^{2+} de las mitocondrias, bloqueando los canales de Ca^{2+} activados por bajo voltaje (Ibeas, y col., 2015). Levetiracetam es un antiepiléptico, el cual no tiene un mecanismo exacto y no está claro como ejerce su efecto antiepiléptico, pero se cree que es único entre otros medicamentos antiepilépticos y se sugiere que la unión de levetiracetam a la proteína de vesícula sináptica 2A (SV2A) modula la transmisión sináptica. La estimulación del SV2A presináptico por levetiracetam puede inhibir la liberación de neurotransmisores, pero no parece afectar la neurotransmisión normal, lo que ha llevado a la sugerencia de que levetiracetam modula exclusivamente la función de SV2A solo bajo condiciones fisiopatológicas. También se ha visto que afecta indirectamente la neurotransmisión GABAérgica y que inhibe los canales de calcio de tipo T y N. Como coadyuvantes se encuentra la zonisamida, que es un anticonvulsivo de sulfonamida aprobado para su uso como terapia adyuvante en

adultos con convulsiones de inicio parcial, bloqueando la activación repetitiva de los canales de sodio dependientes de voltaje, lo que conduce de manera indirecta a una reducción de las corrientes de los canales de calcio de tipo T. La flunarizina se usa como coadyuvante en la terapia de la epilepsia e inhibe la entrada de calcio extracelular a través de los poros de la membrana miocárdica y vascular al obstruir físicamente el canal. (Gomora y col., 2001; Patsalos, 2005; Qian y col., 2019; Santi y col., 2002; Uebele y col., 2009; Caknak, y col., 2015).

Tabla 3. Fármacos usados para el tratamiento de epilepsia dirigidos a CACNA1G. Incluidos anticonvulsivos como aquellos que se usan como coadyuvantes para el tratamiento de diferentes crisis epilépticas (Gomora y col., 2001; Patsalos, 2005; Qian y col., 2019; Santi y col., 2002; Uebele y col., 2009; Caknak, y col., 2015).

NOMBRE	DESCRIPCIÓN	CÓDIGO SMILES
LEVETIRACETAM	Anticonvulsivo de la clase de las pirrolidinas, inhibe los canales de calcio de tipo T y N.	<chem>CCC(C(=O)N)N1CCCC1=O</chem>
METOSUXIMIDA	Anticonvulsivo de succinimida, utilizado principalmente para las crisis de ausencia. Funciona mediante la supresión de patrones paroxísticos de picos.	<chem>CC1(CC(=O)N(C1=O)C)C2=C C=CC=C2</chem>
ETOSUXIMIDA	Anticonvulsivo útil en el tratamiento de las crisis de ausencia. Suprime la actividad paroxística de picos y ondas de tres ciclos por segundo.	<chem>CCC1(CC(=O)NC1=O)C</chem>
TRIMETADIONA	Anticonvulsivo indicado para el control de las convulsiones en crisis de ausencia. Reducen las corrientes de calcio tipo T en las neuronas talámicas.	<chem>CC1(C(=O)N(C(=O)O1)C)C</chem>
ZONISAMIDA	Se une a los canales de sodio y a los canales de calcio sensibles al voltaje	<chem>C1=CC=C2C(=C1)C(=NO2)C S(=O)(=O)N</chem>
FLUNARIZINA	Bloqueador selectivo de la entrada de calcio. Inhibe la entrada de calcio extracelular.	<chem>C1CN(CCN1CC=CC2=CC=C C=C2)C(C3=CC=C(C=C3)F) C4=CC=C(C=C4)F</chem>
CANABIDIOL	Se utiliza para el tratamiento complementario de convulsiones. En 2018, se aprobó para el tratamiento de dos formas raras de epilepsia. Bloquea canales de calcio.	<chem>CCCCC1=CC(=C(C(=C1)O) C2C=C(CCC2C(=C)C)C)O</chem>

Como controles negativos se seleccionaron los fármacos brivaracetam y mefenitoína, los cuales tienen alta similitud estructural con varios de los fármacos de la tabla 3 y no interactúan con CACNA1G, en el caso de mefenitoína, actúa directo con el canal de sodio (Lenkowski, y col., 2004; Zona, y col., 2010). También, brivaracetam presenta una estructura análoga a levetiracetam; sin embargo, brivaracetam presenta menos efectos secundarios que levetiracetam y su diana exclusiva es SV2A. Como control positivo se seleccionó z944 el cual, si bien, no es un fármaco aprobado para su uso como anticonvulsivo, es un inhibidor selectivo de CACNA1G con el que se cristalizó su estructura (Zhao, et al., 2019). También, se han realizado pruebas de sus efectos anticonvulsivos en ratas y evaluaron sus efectos como antagonistas de los canales de calcio (Casillas-Espinoza, et al., 2019) (Tabla 4).

Tabla 4. Estructuras de fármacos controles

CONTROLES NEGATIVOS		CONTROL POSITIVO
BRIVARACETAM	MEFENITOINA	Z944
<chem>CCCC1CC(=O)N(C1)C(CC)C(=O)N</chem>	<chem>CCC1(C(=O)N(C(=O)N1)C)C2=CC=CC=C2</chem>	<chem>CC(C)(C)NC(=O)CN1CCC(CC1)CNC(=O)C2=CC(=CC(=C2)Cl)F</chem>

Para todos estos fármacos se calculó el coeficiente de Tanimoto (Figura 9), la cual es una métrica de similitud utilizada para comparar la similitud de estructuras químicas representadas por medio de sus *fingerprints* y así identificar moléculas con actividades similares y predecir dianas farmacológicas (Bajusz, et al., 2015), para esto se utilizó la Plataforma de Análisis Molecular Unificado: PUMA (González-Medina y Medina-Franco, 2017), la cual realiza seis análisis principales: espacio químico, propiedades estadísticas, similitud o distancia de propiedades, curvas de recuperación de Recuperación Cíclica del Sistema (CSR), Entropía de Shannon Escalada (SSE) con subestructuras moleculares (*scaffolds*) y Función de Distribución Acumulativa (CDF), *scaffolds*, y Función de Distribución Acumulativa (CDF) de valores de similitud por pares calculados con *fingerprints*. Se obtuvo que

los fármacos seleccionados presentaban $\geq 50\%$ de similitud, siendo los que tienen una menor similitud entre sí etosuximida con flunarizina y Z944 y flunarizina con trimetadiona (50%). Particularmente levetiracetam presenta arriba del 90% de similitud con la mayoría de los fármacos; metosuximida, etosuximida, trimetadiona, zonisamida, brivaracetam y mefenitoína. Siendo levetiracetam un fármaco que no se usa como primera línea para el tratamiento de epilepsia de ausencia y que no tiene como diana principal CACNA1G, la similitud estructural, y lo resultados obtenidos en este trabajo podrían proponer análogos a levetiracetam como posibles moléculas de interés farmacológico para epilepsia de ausencia.

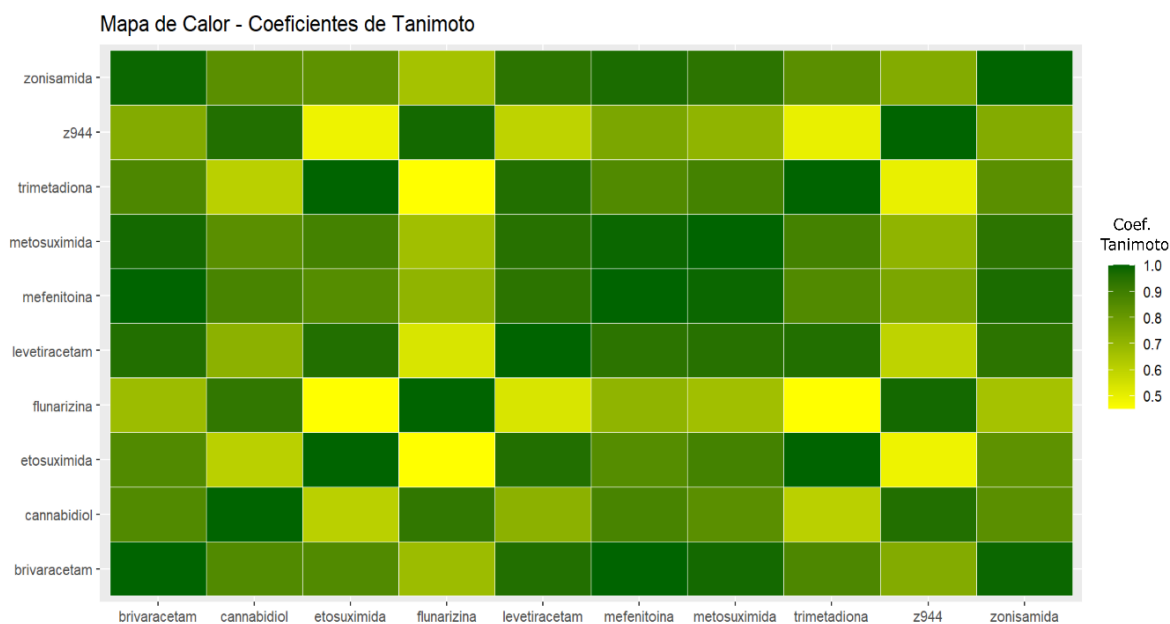


Figura 9. Mapa de calor del coeficiente de Tanimoto de los fármacos seleccionados.

7.2 Modelado por Homología de CACNA1G

Debido a que las estructuras tridimensionales obtenidas por criomicroscopía presentan ciertas limitantes, como su carácter incompleto, esto podría ocasionar variaciones en los resultados obtenidos y dificultades en el análisis de la dinámica molecular. Con el objetivo de evitar estas limitaciones y garantizar una aproximación

más precisa, se tomó la decisión de realizar modelado por homología de la proteína. Para la construcción del modelo se descargó la secuencia de aminoácidos de CACNA1G de humano de UniProt (ID: O43497). Utilizamos como estructura base, para el modelo por homología, la estructura presente en el PDB 6KZO; la cual es la estructura de CACNA1G. Esta estructura no se encuentra completa, por lo cual se optó por realizar modelado por homología. 6KZO fue cristalizada en estado basal, la cual nos permitiría, en estudios posteriores, observar los cambios estructurales relacionadas con la interacción con el ligando. La secuencia de CACNA1G se cargó en los servidores Robetta, I-TASSER y *SwissModel*, con la intención de evaluar qué servidor nos da un mejor modelo.

Debido a que CACNA1G consta de 2377 residuos, y los servidores I-TASSER y Robetta no permiten modelar proteínas de tamaño tan grande, se optó por dividir en 4 partes a la proteína, respetando los dominios que la conforman para no perder coherencia. La división fue la siguiente; I: 1-800, II: 300-1300, III: 900-1700, IV: 1500-2377 (Figura 10 y 11), dejando suficientes residuos de cada extremo en la división, con el objetivo de seleccionar los mejores modelos y posteriormente unirlos manualmente para obtener el modelo completo de CACNA1G. El servidor *SwissModel* permitió modelar la proteína completa, sin necesidad de dividirla en segmentos.

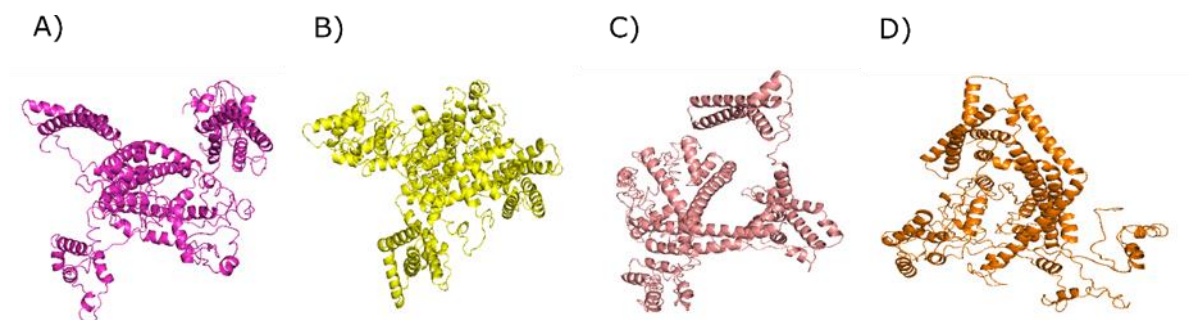


Figura 10. Modelado de los segmentos por I-TASSER. A) Segmento I. Abarca del residuo 1-800. B) Segmento 2. Abarca del residuo 300-1300. C) Segmento 3. Abarca del segmento 900-1700. D) Segmento 4. Abarca del residuo 1500-2377.

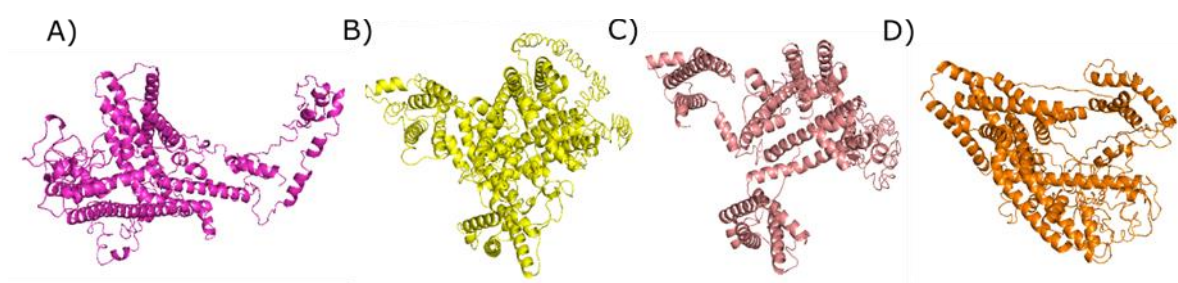


Figura 11. Modelado de los segmentos por Robetta. A) Segmento I.

Al tener los segmentos ya modelados, estos fueron evaluados en MolProbity para observar su calidad mediante el análisis del *z-score* y los residuos favorecidos en el diagrama de Ramachandran, este último muestra los ángulos de torsión en nuestra proteína, donde un porcentaje mayor a 80% de residuos favorecidos indica una buena estereoquímica del modelo. Adicionalmente, el servidor de I-TASSER proporciona sus propios parámetros de calidad como lo son el *c-score* y el *TM-score* (rango de -5 a -2) y *TM-score* (valores mayores a 0.5 indican una correcta topología) (Jha, y col., 2018).

La tabla 5 muestra los valores obtenidos de los segmentos modelados en los tres diferentes servidores y los valores obtenidos. Al obtener los modelos por segmentos de Robetta y I-TASSER, se construyó el modelo uniéndolos manualmente usando Schrödinger Maestro, obteniendo un modelo quimera y se hizo un análisis de calidad del modelo completo (tabla 6). Los diagramas de Ramachandran, tanto de los segmentos y de los modelos, se encuentran en el Anexo I.

Tabla 5. Análisis de calidad de los modelos por homología.

SERVIDOR	TM-score	C-score	Z-SCORE	RESIDUOS	RESIDUOS
			(<2)	FAVORECIDOS	PERMITIDOS
ROBETTA (SEG1)	-	-	-0,22 ± 0,29	92.50%	98.10%
ROBETTA (SEG2)	-	-	-5,83 ± 0,19	69.90%	85.80%
ROBETTA (SEG3)	-	-	-5,37 ± 0,23	71.40%	86.00%
ROBETTA (SEG4)	-	-	-4,63 ± 0,25	75.70%	91.50%
SWISSMODEL			-1,26 ± 0,19	84.60%	94.90%
I-TASSER (SEG1)	0.62 ± 0-14	-0.7	- 5,74 ± 0,21	73.70%	90.40%
I-TASSER (SEG2)	0.39 ± 0.13	-2.89	-5,54 ± 0,19	70.00%	89.70%
I-TASSER (SEG3)	0.42 ± 0.17	-0.9	-4,79 ± 0,25	74.70%	88.60%
I-TASSER (SEG4)	0.58 ± 0.12	-0.6	-4,75 ± 0,25	76.40%	91.90%

Tabla 6. Análisis de calidad de los modelos quimera.

SERVIDOR	Z-SCORE (<2)	RESIDUOS FAVORECIDOS	RESIDUOS PERMITIDOS
ROBETTA	-3,43 ± 0,15	82.50%	94.00%
I-TASSER	-6,54 ± 0,12	65.00%	87.50%

Otro factor para considerar es la coherencia estructural en relación con lo reportado, por lo cual, después del análisis de calidad se realizó un análisis visual del modelo (Fig. 12).

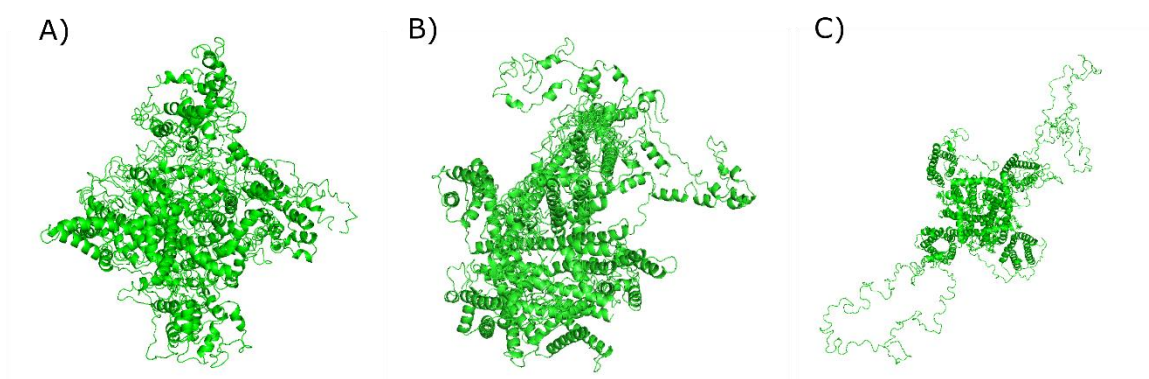


Figura 12. Modelos Completos de CACNA1G. A) Modelo quimera basado en los segmentos modelados por ITASSER. B) Modelo quimera basado en los segmentos modelados por Robetta. C) Modelo por homología construido por SwissModel.

El modelo obtenido del servidor Robetta presentó un número aceptable de residuos favorecidos pero la geometría estructural del modelo no concordaba con lo reportado en las criomicroscopias de 6KZO y 6KZP. El modelo de *Swiss model*, también presentaba un número de residuos favorecidos aceptables y un *Z-score* adecuado; sin embargo, los *loops* observados (Figura 10C) son residuos que deberían encontrarse en la zona transmembranal de nuestra proteína, por lo que el modelo que nos arrojó el servidor no fue útil. Se seleccionó el modelo proporcionado por I-TASSER ya que, aunque los residuos favorecidos fueron del 65%, muy por debajo de los modelos obtenidos por Robetta y SwissModel, y el valor de *z-score* no fue adecuado, este modelo presentaba una mayor coherencia estructural con los modelos reportado en la cristalografía de 6KZO y 6KZP (Zhao, y col., 2019). Para mejorar el porcentaje de residuos favorecidos optimizando la estructura se sometió a simulaciones de dinámica molecular.

7.3 Optimización del modelo por dinámica molecular *All-Atom* (AA-MD) y *Coarse-Grained* (CG-MD)

7.3.1 Dinámicas moleculares *Croased-Grained*

Para mejorar la estereoquímica del modelo, este se sometió a una CG-MD, con la finalidad de relajar la estructura y de esta manera mejorar su geometría. Se utilizaron dos campos de fuerza, Martini22p y Eldenynp22, para comparar los resultados obtenidos y seleccionar el modelo que conserva mejor sus estructuras secundarias. El campo de fuerza Martini22p es adecuado para sistemas de biomoléculas con una concentración iónica baja a moderada. Eldenynp22 se basa en términos de su capacidad para simular sistemas biológicos complejos. En general, se considera que el campo de fuerza Eldenynp22 es más preciso que el campo de fuerza Martini22p en la descripción de la estructura y la dinámica de proteínas grandes debido a su capacidad para tratar partículas finas en regiones críticas de la proteína, como las interacciones electrostáticas y los sitios activos (De Jong, y col., 2013; Periolé, y col., 2009)

En el análisis de calidad del clúster obtenido a partir las CG-MD se observó que disminuyeron los residuos favorecidos a un 61% con ambos campos de fuerza. En la tabla 7 se muestran los resultados del análisis en Molprobitry del clúster obtenido en las dinámicas obtenidas. Al realizar un análisis visual de nuestros clústeres se observó que las estructuras secundarias como las alfa hélices y beta laminas perdió su conformación tridimensional (Figura 13).

Tabla 7. Análisis de calidad de los modelos obtenidos después de CG-MD.

CAMPO DE FUERZA	Z-SCORE	RESIDUOS FAVORECIDOS	RESIDUOS PERMITIDOS
MARTINI22P	-6.71	61.30%	86.90%
ELDENYNP22	-6.56	61.90%	87.40%

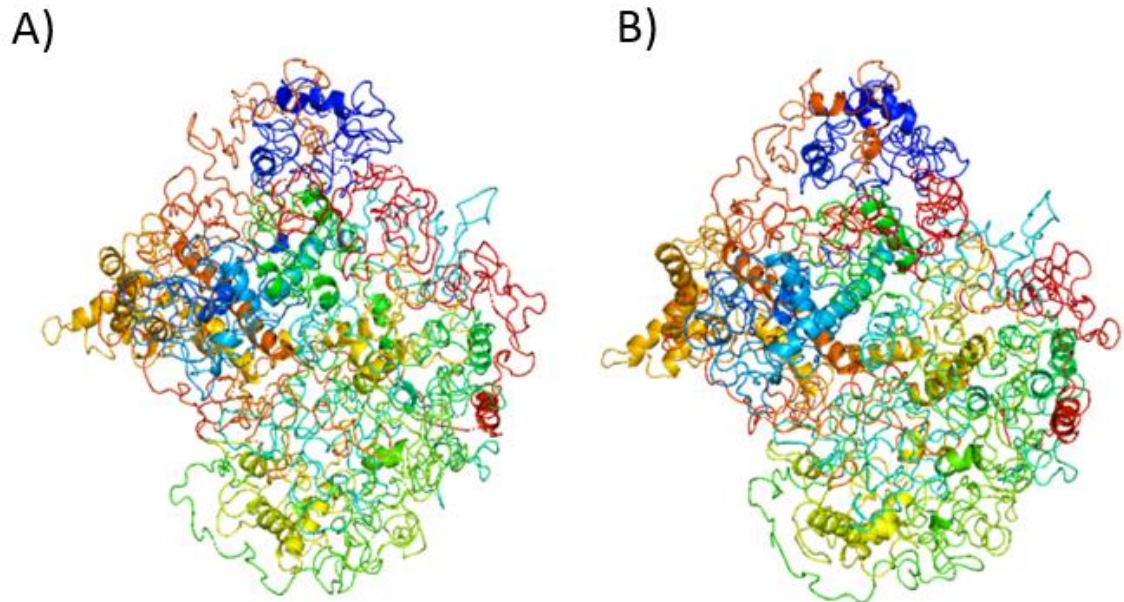


Figura 13. Clúster 1 obtenido después de Dinámica *Croased-Grained*. A) Usando campo de fuerza Martini22. B) Campo de fuerza eldenynp22p

7.3.2 Dinámicas moléculas *All-Atom*

Debido a los resultados obtenidos de las dinámicas CG-MD, se decidió llevar a cabo dinámicas de tipo *All-Atom* de 200 ns, con el objetivo de conservar lo mejor posible las estructuras secundarias de la proteína. Ya que CACNA1G está influenciado por la presencia de iones específicos, se decidió realizar las simulaciones de tres sistemas diferentes, modificando el tipo de ion presente en el sistema; NaCl, CaCl₂ y KCl, con la finalidad de observar si los iones del sistema afectan al comportamiento de la proteína. Las dinámicas con cada sistema se realizaron por triplicado. Al tener el triplicado de cada sistema se realizó un análisis global y se evaluó el RMSD tanto de la proteína completa como del poro, para verificar que el tiempo de simulación fuera el adecuado esperando nuestro sistema se haya estabilizado (Anexo II). Posteriormente, se unieron las trayectorias para poder seleccionar los clústeres

representativos realizando un Análisis de Componentes Principales (PCA) de cada sistema (Anexo III).

7.3.2.1 Sistemas con NaCl

Tras las simulaciones y el análisis de PCA, se seleccionaron los grupos 1 y 3 de NaCl correspondientes a los tiempos de simulación 743.9 ns y 229.2 ns, respectivamente. Posteriormente, fueron evaluados en Molprobit para observar su calidad mediante el análisis del Z-score y los residuos favorecidos y permitidos en el diagrama de Ramachandran. Los clústeres 1 y 3 presentaron un 82.80% y 84.30% de residuos favorecidos, y un 92.60% y 93.50% de residuos permitidos, respectivamente (tabla 8). Ambos modelos mejoraron de forma significativa con respecto a la estructura inicial, lo cual nos indica que la dinámica molecular logró optimizar la geometría de nuestra proteína.

Tabla 8. Grupos representativos de las dinámicas realizadas con sistemas con NaCl. Se observa el número de grupos seleccionado y los valores obtenidos de Molprobit.

SISTEMA	CLÚSTER	Z-SCORE (<2)	RESIDUOS FAVORECIDOS	RESIDUOS PERMITIDOS
NaCl	1	-3.43	82.80%	92.60%
NaCl	3	-3.38	84.30%	93.50%

Se realizó un alineamiento de las estructuras para evaluar la diferencia del RMSD entre las estructuras representativas (Figura 14). Los valores de RMSD obtenidos en relación con la estructura original fueron de 4.97 Å con el clúster 1 y 5.33 Å en relación con el clúster 3, lo cual indica que si hay una diferencia significativa entre la estructura inicial y entre grupos. El grupo 1 tuvo un RMSD de 5.11 Å con respecto al 3, por lo cual ambos clústeres seleccionados son diferentes entre sí.

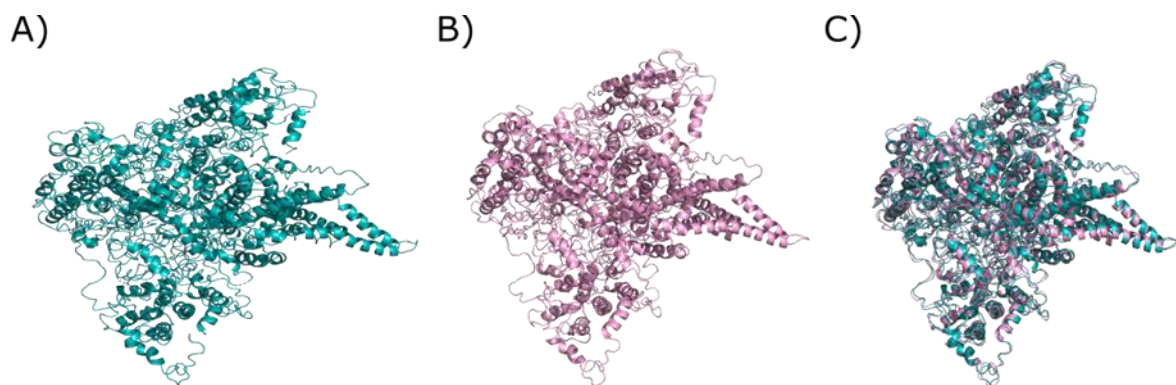


Figura 14. Estructuras representativas con sistema NaCl. A) *Frame 0*. B) Clúster más numeroso de la simulación. C) Alineamiento de las estructuras.

7.3.2.2 Sistemas con CaCl₂

Para las simulaciones con calcio, se seleccionaron los clústeres 1 y 2, correspondientes a los tiempos 551.3 ns y 343.9 ns, respectivamente. Los valores de calidad obtenidos en MolProbity indicaron un 83.90% de residuos favorecidos y un 93.10% de todos los permitidos para el grupo 1. Para el clúster 2 se obtuvo un 84.80% de residuos favorecidos y un 93.50% de todos los permitidos. Ambos modelos tuvieron una mejora significativa en comparación con los modelos quimera iniciales (tabla 9).

Tabla 9. Grupos representativos de la dinámica con CaCl₂. Se observa el número de grupos seleccionado y los valores obtenidos de MolProbity

SISTEM	CLÚSTER	Z-SCORE (<2)	RESIDUOS FAVORECIDOS	RESIDUOS PERMITIDOS
CaCl ₂	1	-3.41	83.90%	93.10%
CaCl ₂	2	-3.46	84.80%	93.50%

El RMSD en relación con la estructura inicial fue de 4.99 Å con el clúster 1 y de 6.04 Å en relación con el clúster 2. Entre el clúster 1 y el 2 se obtuvo en RMSD de 5.18

Å, por lo cual existen diferencias significativas entre la estructura inicial y los clústeres seleccionados para las siguientes evaluaciones (Figura 15).

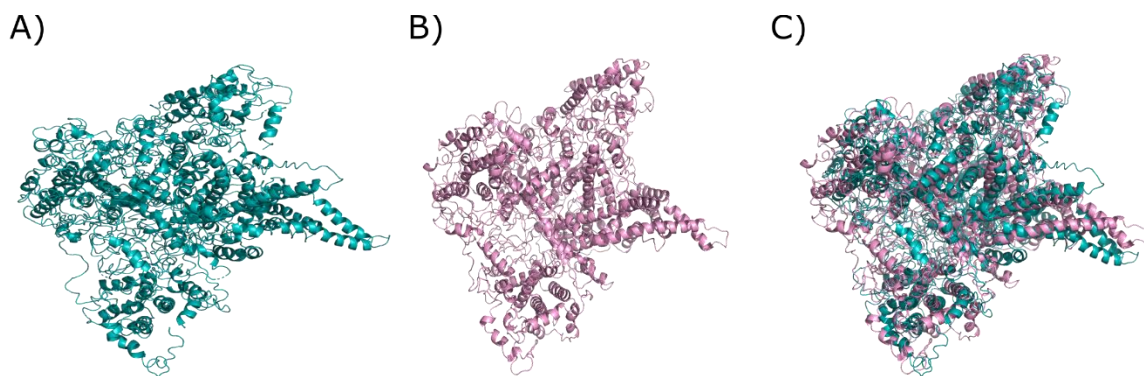


Figura 15. Estructuras representativas con sistema CaCl_2 . A) *Frame 0*. B) Clúster más numeroso de la simulación. C) Alineamiento de las estructuras.

7.3.2.3 Sistemas con KCl

Se seleccionaron los clústeres 1 y 2 de KCl, correspondientes a los tiempos 324.8 ns y 104.3 ns, respectivamente. El análisis de calidad de los modelos mostró 84.40% de residuos favorecidos y 93.80% de residuos permitidos para el clúster 1, y 84.00% de residuos favorecidos y 92.90% de residuos permitidos para el clúster 2. (Tabla 10).

Tabla 10. Grupos representativos de cada dinámica. Se observa el número de grupo seleccionado, obtenido de cada sistema simulado y los valores obtenidos de MolProbity.

SISTEMA	CLÚSTER	Z-SCORE (<2)	RESIDUOS FAVORECIDOS	RESIDUOS PERMITIDOS
KCl	1	-3.61	84.40%	93.80%
KCl	2	-3.6	84.00%	92.90%

Los resultados del análisis de calidad muestran que los clústeres, a comparación del modelo inicial, mejoran de forma considerable los residuos favorecidos y permitidos en el diagrama de Ramachandran, teniendo que todas nuestras conformaciones representativas de cada sistema se encuentran con un porcentaje mayor del 80% de residuos favorecidos y permitidos.

El RMSD en relación con la estructura inicial fue de 5.20 Å con el clúster 1 y de 5.24 Å en relación con el clúster 2. Entre el grupo 1 y el 2 se obtuvo un RMSD de 5.73 Å, por lo cual existen diferencias significativas entre la estructura inicial y los clústeres seleccionados para las siguientes evaluaciones (Figura 14).

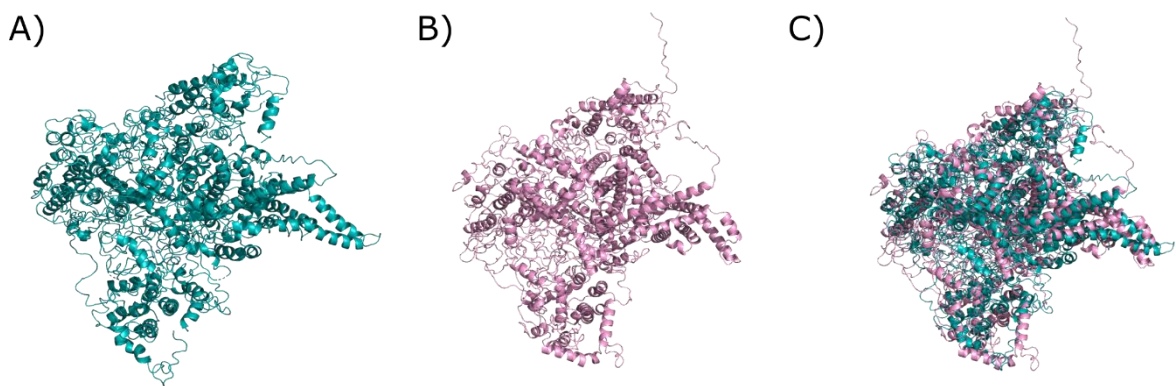


Figura 16. Estructuras representativas con sistema CaCl₂. A) Frame 0. B) Clúster más numeroso de la simulación. C) Alineamiento de las estructuras.

Al finalizar las MD, se propuso evaluar el volumen del poro obtenido de la trayectoria conjunta, seleccionando un *frame* cada 25 ns, a fin de observar si existía un cambio conformacional, durante la simulación bajo los diferentes sistemas. Utilizamos el software POVME3.0 (Wagner, et al., 2017). Se utilizaron los datos recopilados en el estudio y se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk (Royston, 1992) utilizando un nivel de significancia de $\alpha=0.05$. Los resultados del análisis indicaron que los datos no cumplieron con el supuesto de normalidad ($p<0.05$), por lo tanto, se rechazó la

hipótesis nula y se concluyó que los datos no siguen una distribución normal. Posteriormente, debido a que no presentan distribución normal, se realizó un análisis estadístico utilizando la prueba de Kruskal-Wallis (McKight y Najab, 2018) para evaluar las diferencias en el volumen de la muestra entre los tres grupos (CaCl₂, KCl y NaCl). Los resultados mostraron una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($\chi^2= 10.658$, $p= 0.004$) posteriormente, se hicieron comparaciones por pares utilizando la prueba Wilcoxon (Cuzick, 1985). Las comparaciones no mostraron diferencia significativa entre el grupo de KCl y el de CaCl₂ ($p= 0.611$) y NaCl y KCl ($p=0.194$), sin embargo, si se observaron diferencias significativas entre los grupos NaCl y KCl ($p=0.003$), se aplicó el método de ajuste de Bonferroni para controlar el error debido a las múltiples comparaciones (McLaughlin, et al., 2014).

CACNA1G es dependiente de iones por lo cual esperaríamos que hubiera una diferencia entre los iones que se encuentran en el sistema, los resultados nos indican que sólo existe una diferencia entre CaCl₂ y NaCl; sin embargo en la figura 17 podemos observar, que si bien no hay una diferencia significativa entre KCl y CaCl₂, la mayoría de los *frames* seleccionados se agrupan en un volumen menor a 200 A³ en el sistema de CaCl₂, en KCl en aproximadamente 375 A³ y en NaCl en 250 A³, por lo que probablemente, si seleccionamos más *frames* podríamos obtener diferencias entre todos los grupos. También hay que tener en cuenta que el canal también responde ante estímulos de voltaje determinado por la concentración diferencial de iones en las dos caras de la membrana lipídica, por lo que, para que haya un cambio conformacional es necesario también considerar este factor.

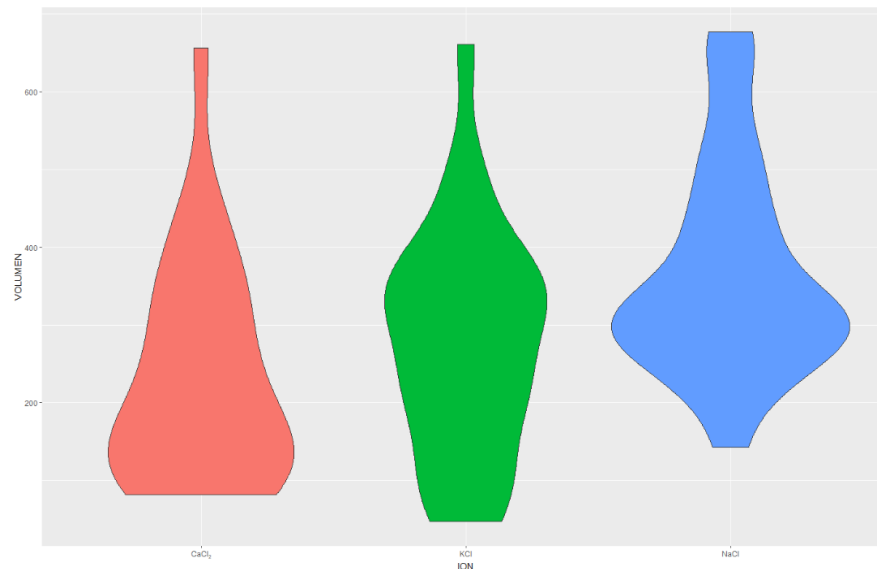


Figura 17. Análisis del poro bajo las diferentes condiciones. en rojo se muestran los volúmenes de los *frames* usando CaCl₂, en rojo usando KCl y en azul usando NaCl como fuentes de cationes.

Los resultados obtenidos nos dan pauta para considerar que los iones que se encuentran en el sistema pueden ejercer cambios conformacionales en nuestra proteína, lo cual proporciona una estrategia para futuros estudios. Sin embargo, es necesario definir estrategias que consideren, no solo los iones en el sistema, sino también el cambio de concentración de estos y el potencial de acción necesario para su función.

También se probaron diferentes programas como Caver analyst (Jurick, 2018), Mole online (Berka, et al., 2012) y Hole (Smarts, et al., 1996); sin embargo, todos los servidores presentaban deficiencias ya que no detectaban todo el poro y el volumen que arrojaban era impreciso, por lo cual estos resultados no se presentan. Esta limitación puede deberse a limitaciones de las herramientas computacionales, o bien, ya que las dimensiones de nuestra proteína son muy grandes, esto puede generar un error al momento de calcular el volumen. Es necesario realizar una búsqueda más exhaustiva de diferentes programas y servidores web que nos permitan realizar análisis de este tipo o desarrollar estrategias computacionales que nos permitan hacer este tipo de mediciones en modelos tridimensionales de gran tamaño, por lo que es un área de oportunidad para futuros estudios, ya que ninguna herramienta puede garantizar la identificación de un túnel o cavidad (Brezovsky, et al., 2013).

7.4 Acoplamiento molecular de los complejos Ligando-Proteína

Se realizaron los acoplamiento molecular bajo diferentes condiciones; utilizando los dos clústeres seleccionados de cada sistema, se hicieron acoplamiento molecular de los 10 ligandos seleccionados utilizando 2 algoritmos; ADADELTA y Solis-Wets, para obtener las conformaciones de los ligandos. Estos acoplamiento se realizaron por triplicado, teniendo en total 120 acoplamiento por sistema; en total 360 acoplamiento. De cada ligando obtuvimos su estructura *Lowest Energy* (LE) y *Best Cluster* (BC). Con un total de 720 conformaciones diferentes a analizar.

Se realizó un análisis de RMSD para analizar todas las conformaciones obtenidas de cada ligando, realizando una matriz de correlación de RMSD entre las conformaciones LE y BC para cada ligando por cada algoritmo de búsqueda, agrupando las conformaciones similares (Anexo IV). Para la selección de la estructura representativa de *docking* se tomaron en cuenta diferentes criterios: primero, la obtención de las conformaciones más numerosas de cada ligando, y posteriormente, se seleccionaron las estructuras en donde el RMSD fuera lo menor posible y que tuvieran un buen *docking score*. Se seleccionó una conformación de cada ligando (Figura 18) (Tabla 11).

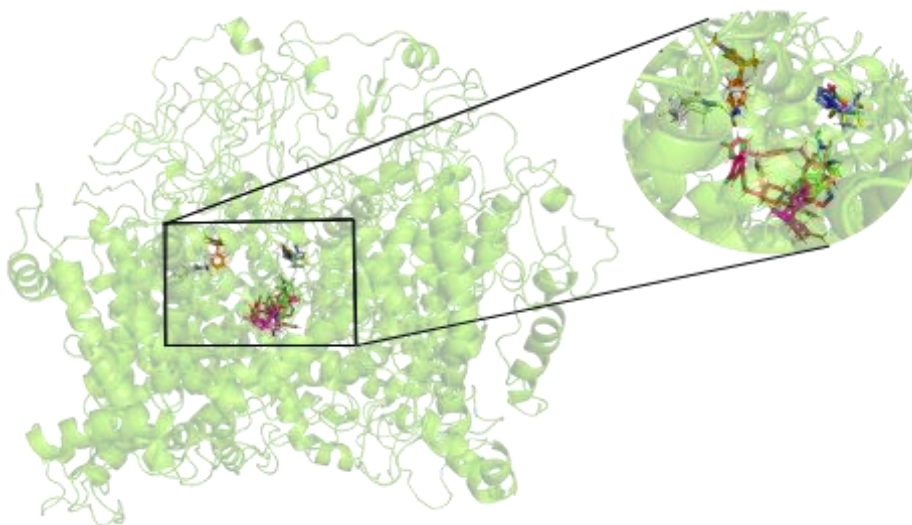


Figura 18. Representación del sitio de acoplamiento molecular de los ligandos.

Tabla 11. Resultados del Acoplamiento molecular. Se muestra el resultado seleccionado de la conformación más representativa de cada ligando y las condiciones en las que se obtuvo.

Fármaco	Sistema	No. clúster	Conformación	Algoritmo	No. Docking	Docking score (kcal/mol)
Brivaracetam	KCl	2	LE	Adadelta	1	-5.50
Cannabidiol	NaCl	3	LE	Adadelta	3	-8.85
Etosuximida	CaCl ₂	1	LE	SolisWets	1	-5.61
Flunarizina	CaCl ₂	2	BC	SolisWets	1	-9.77
Levetiracetam	CaCl ₂	1	LE	Adadelta	3	-5.42
Mefenitoína	KCl	1	LE	SolisWets	1	-6.96
Metosuximida	NaCl	1	LE	Adadelta	1	-7.55
Trimetadiona	CaCl ₂	1	LE	Adadelta	3	-5.27
Z944	NaCl	1	BC	SolisWets	3	-9.37
Zonisamida	NaCl	1	BC	SolisWets	3	-6.77

7.4.1 Acoplamiento de brivaracetam y mefenitoína

En los controles negativos, se observó que brivaracetam no presentaba ningún tipo de interacción polar con CACNA1G (Figura 19A). Sin embargo, mefenitoína presentó interacción mediada por puente de hidrógeno con Val³⁵⁷, Trp³⁵⁶, Lys⁹²⁷ con los oxígenos del carbonilo y Asp⁹²⁴ con el hidrogeno del grupo amino (Figura 19B). Los controles negativos se unen en el mismo sitio de unión, pero el ambiente químico dado por los residuos alrededor es diferente al control positivo, esto podría estar relacionado con los cambios conformacionales relevantes para la actividad del control positivo en CACNA1G.

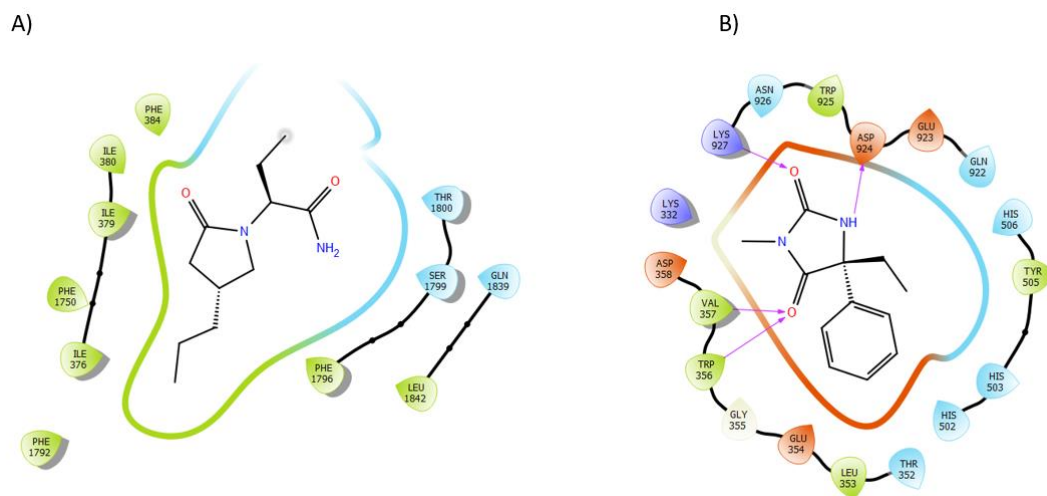


Figura 19. Diagrama de interacción de los controles negativos. A) Brivaracetam. B) Mefenitoína

7.4.2 Acoplamiento de Z944

Se seleccionó como control positivo Z944, el cual mostró interacciones mediadas por puentes de hidrógenos con His⁴⁹⁷ con el grupo amino y Lys¹⁴⁸⁵ con los oxígenos de los carbonilos y un enlace de halógeno con His⁵⁰³ con el cloro del benceno (Figura 20). Los halógenos, como el cloro, pueden formar interacciones σ -hole, la cual se refiere a una región de potencial electrostático positivo en la parte más externa de la superficie de un átomo de halógeno, centrada en el eje R-X. Esta región es responsable del enlace del enlace de halógeno, interacción de tipo no covalente (Politzer, et al., 2013; Kolár y Hobza, 2016). En la Cryo-EM de CACNA1G en complejo con z944 se observan interacciones con residuos de los segmentos S6 de los dominios (Zhao, et al., 2019), sin embargo, los residuos con los que interaccionó nuestro complejo son de la región extracelular, no son residuos formadores del poro, aun cuando las coordenadas utilizadas para el *docking* son las mismas que lo reportado. Esto podría deberse a que se trata de un complejo rígido, esperando que tras las dinámicas moleculares se pudieran observar interacciones con los residuos de los segmentos S6. También, es necesario tener en cuenta que

se adicionaron residuos que la cristalografía no tenía, por lo que la presencia de estos pudiera modificar la interacción del ligando en comparación a la criomicroscopía o la conformación del sitio de unión.

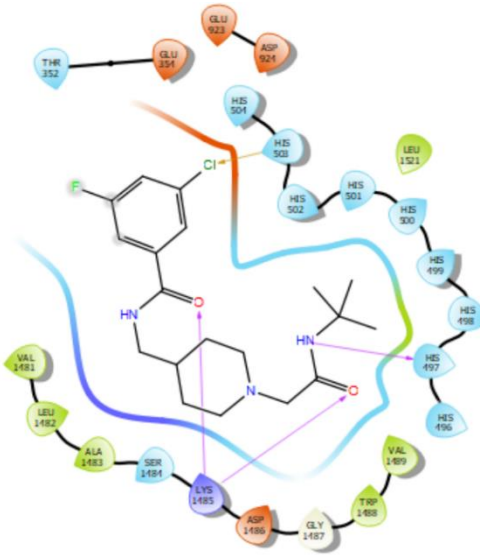


Figura 20. Acoplamiento molecular de CACNA1G con Z944

7.4.3 Acoplamiento molecular de los ligandos seleccionados.

En el acoplamiento molecular de los ligandos seleccionados se observó que cannabidiol presentó una interacción mediada por puentes de hidrógeno con Asp¹⁴⁸⁶ (Figura 21A). Flunarizina no presentó ninguna interacción formal; sin embargo, fue el mejor *docking score* obtenido (Figura 21B). Levetiracetam, presentó interacción mediada por puente de hidrógeno con Gly¹⁴⁸⁷ con el oxígeno del carbonilo y con el grupo amino (Figura 21C). Trimetadiona presentó interacciones mediadas por puentes de hidrógeno con His⁴⁹⁷ y Gly¹⁴⁸⁷ con los oxígenos del carbonilo (Figura 21D). Zonisamida, presentó una interacción de tipo π - π con His⁴⁹⁷ y mediadas por puentes de hidrógeno con Lys¹⁴⁸⁵ y Trp¹⁴⁸⁸ con los oxígenos del carbonilo y con Ala¹⁴⁸³ con el hidrógeno del grupo amino (Figura 21E). Estos fármacos son inhibidores del canal, por lo que parece ser fundamental la interacción con Gly¹⁴⁸⁷ e His⁴⁹⁷ para su función, residuos que se encuentran en la región extracelular.

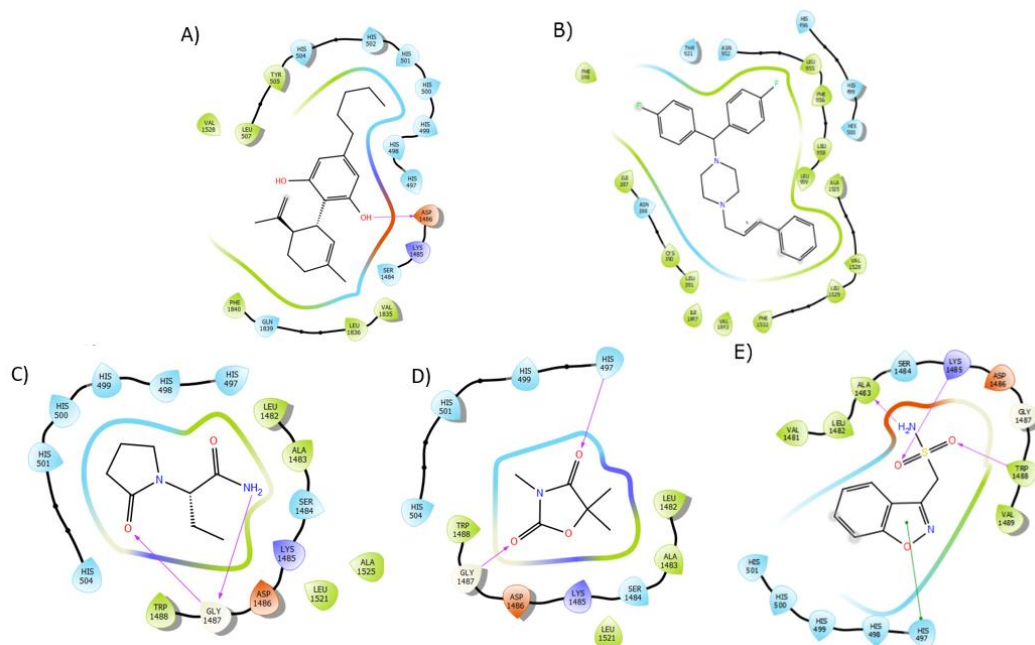


Figura 21. Acoplamiento molecular de los ligandos seleccionados. A) Cannabidiol B) Flunarizina C) Levetiracetam D) Trimetadiona E) Zonisamida

7.4.3.1 Acoplamiento molecular de las succinimidias; etosuximida y metosuximida

En el acoplamiento molecular de etosuximida se observaron interacciones de tipo puente de hidrógeno con la His⁷⁹⁷ y Gly¹⁴⁸⁷ y metosuximida también mostró interacción de tipo de puente de hidrógeno con Gly¹⁴⁸⁷ y Val¹⁴⁸⁹. Por lo que, para las succinimidias, parece ser fundamental los oxígenos del carbonilo para la formación de interacciones de tipo puente de hidrógeno (Figura 22).

Los valores obtenidos de los *docking score* corresponden a lo reportado con Cacnak y colaboradores en el 2022, los cuales, utilizando la interfaz de Autodock Vina, hicieron acoplamiento molecular de algunos fármacos anticonvulsivos, incluyendo metosuximida, mefenitoina, zonisamida, levetiracetam, etosuximida y trimetadiona.

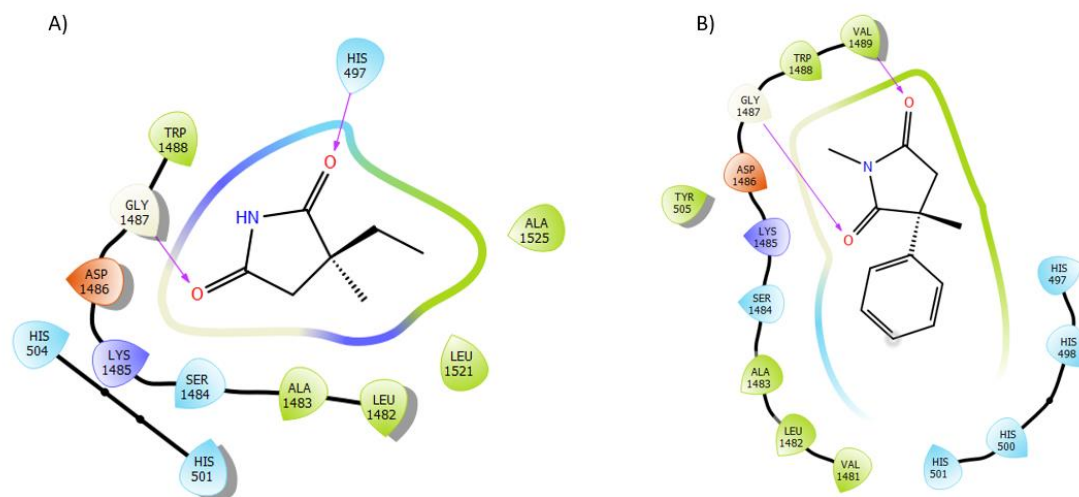


Figura 22. Diagramas de interacción. A) Etosuximida B) Metosuximida

7.5 Dinámicas moleculares de tipo AA-MD de los complejos ligando-proteína

Se realizaron los complejos de los fármacos con CACNA1G y se construyeron los sistemas de cada uno con topología *all-atom*, posteriormente, se realizaron las dinámicas en Gromacs. Las AA-MD realizadas fueron de 100 ns, en las cuales se evaluó el RMSD de cada complejo, tanto de la proteína como del poro, para verificar que el tiempo de simulación fuera el adecuado esperando que el complejo se haya estabilizado para visualizar si los residuos del poro y del ligando se estabilizan durante la simulación, en cada uno de los complejos. También, se evaluó el RMSF de las simulaciones para monitorear las fluctuaciones de los residuos durante la simulación. Tanto los RMSD de la proteína como los RMSF se encuentran en el anexo V. Las dinámicas fueron estables en términos de presión, temperatura, densidad y volumen. Para el análisis del RMSD del poro, los residuos formadores de este se obtuvieron de UniProt (código: O43497) (tabla 12).

Tabla 12. Residuos formadores del poro de CACNA1G.

RESIDUOS							
dominio 1		dominio 2		dominio 3		dominio 4	
seg5	seg6	seg5	seg6	seg5	seg6	seg5	seg6
214-234	371-395	868-888	940-964	1411-1434	1512-1537	1746-1766	1827-1854

7.5.1 Controles negativos

7.5.1.1 Brivaracetam

El RMSD del poro del complejo CACNA1G-Brivaracetam mostró que a partir de los 10 ns se empieza a estabilizar los segmentos del poro y cerca de los 80 ns fluctúa de nuevo, sin embargo, el movimiento es de menos de 0.05 nm, por lo cual podemos decir que el poro se estabiliza durante la dinámica. En relación con brivaracetam, se observaron ciertas fluctuaciones de movimiento al principio, las cuales fueron de menos de 0.1 nm y a partir de los 30 ns se estabiliza el ligando (Figura 23A). Posterior a la dinámica, se seleccionó el clúster más representativo de la simulación para evaluar las interacciones formadas, en el caso de Brivaracetam no se observó ningún tipo de interacción polar con CACNA1G (Figura 23B), lo cual corresponde con lo observado en el acoplamiento molecular.

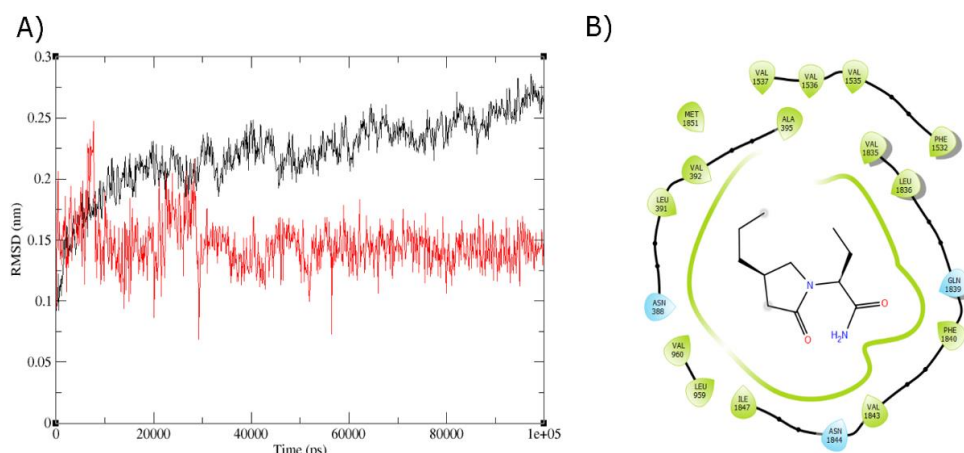


Figura 23. Brivaracetam A) Diagrama de RMSD del poro con brivaracetam. La línea roja representa el ligando y la línea negra representa el poro. B) Diagrama de interacción.

7.5.1.2 Mefenitoína

El RMSD mostró que a partir de los 10 ns se logra estabilizar el poro del complejo CACNA1G-Mefenitoína, y se mantiene estable durante toda la simulación. En relación con mefenitoína, se mantuvo estable los primeros 50 ns, posteriormente muestra movimientos de menos de 0.05 nm y se vuelve a estabilizar el resto de la simulación, este movimiento no resulta ser un cambio significativo (Figura 24A). El diagrama de interacción nos muestra que se formó una interacción de tipo puente de hidrógeno con Asp⁹²⁴, la cual también se observó en el acoplamiento molecular, sin embargo, se perdieron las interacciones con Val³⁵⁷, Trp³⁵⁶ y Lys⁹²⁷ que se observaron en el acoplamiento (Figura 24B).

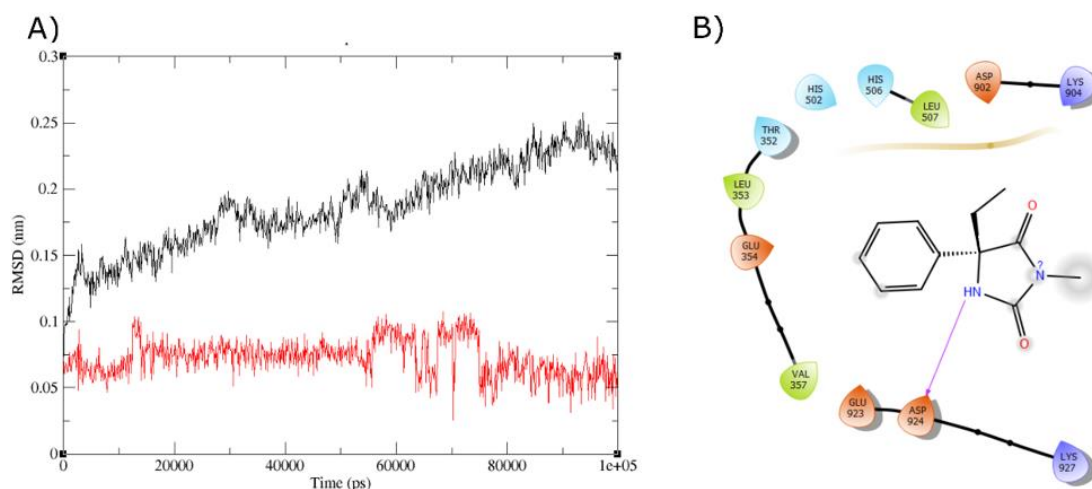


Figura 24. Mefenitoína A) Diagrama de RMSD del poro con mefenitoína. La línea roja representa el ligando y la línea negra representa el poro. B) Diagrama de interacción.

7.5.2 Control positivo

7.5.2.1 Z944

Durante la simulación se observó que el RMSD fluctuó menos de 0.1 nm, por lo cual no es un movimiento significativo, y alrededor de los 80 ns deja disminuir ese movimiento, lo que significa que se mantuvo estable durante la simulación. Con el ligando, z944, sucedió lo mismo, se movió menos de 0.2 nm durante toda la simulación, si bien, hay movimiento durante toda la dinámica, sigue siendo poco, por lo que no se considera significativo (Figura 25A). La estructura representativa de la simulación mostró una interacción de tipo π - π con Phe¹⁵³² con el anillo de fenilo, esta interacción es diferente a las observadas en el acoplamiento molecular, esto, probablemente, debido a que, durante la simulación, el ligando se acomodó en un sitio óptimo, sin embargo, ese movimiento fue mínimo. También, el ambiente químico observado en el complejo CACNA1G-Z944, es diferente al que se observó con los controles negativos, el cual podría estar relacionado con la función de inhibidor del canal (Figura 25B). Según Zhao y col (2019), existen reordenamientos

estructurales en las hélices de los segmentos S6 en los dominios del 1 al 3. Phe¹⁵³² es un residuo que se encuentra en dominio III segmento S6, por lo que corresponde parcialmente al menos con lo reportado.

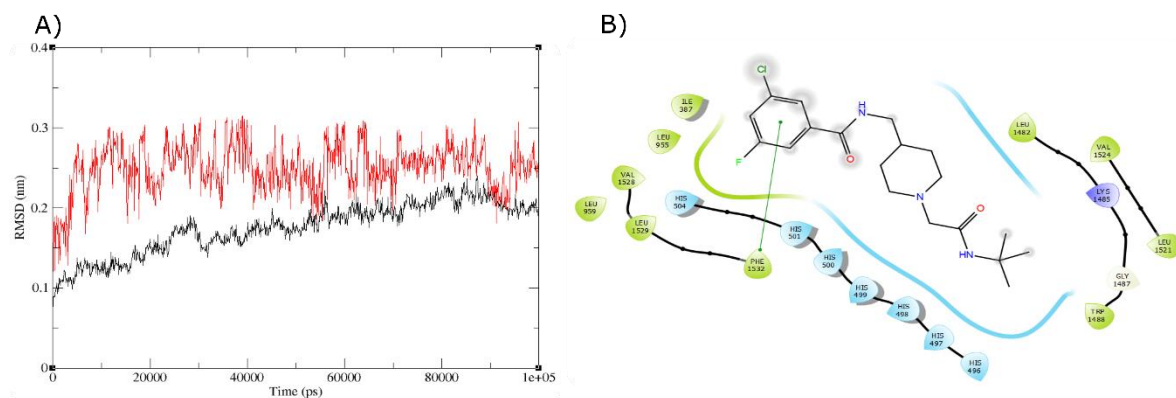


Figura 25. Z944 A) Diagrama de RMSD del poro con z944. La línea roja representa el ligando y la línea negra representa el poro. B) Diagrama de interacción.

7.5.3 Ligandos seleccionados

7.5.3.1 Cannabidiol

El RMSD del poro se mantuvo estable hasta los 30 ns, varió menos de 0.05 nm y siguió estable hasta los 78 ns, posteriormente se movió cerca de 0.15 nm cada 5 y 10 ns. La conformación no se mantuvo estable toda la simulación, sin embargo, los cambios fueron menores a 0.2 nm. En relación con el ligando, cannabidiol, se observaron ciertas fluctuaciones de movimiento al principio de la simulación, las cuales fueron de menos de 0.1 nm (Figura 26A). El grupo hidroxilo del cannabidiol formó interacción mediada por puente de hidrógeno con Asn³⁸⁸, este residuo forma parte del segmento S6 del dominio I, segmento formador del poro, esta interacción es diferente a las observadas durante el acoplamiento molecular, debido a que el sitio en el que se acomodó durante la simulación, es diferente que en el *docking*, lo cual crea un ambiente químico diferente que expone otros residuos de CACNA1G que pueden interactuar con cannabidiol o que a su vez, este ambiente pueda favorecer su actividad como fármaco inhibidor del canal (Figura 26B).

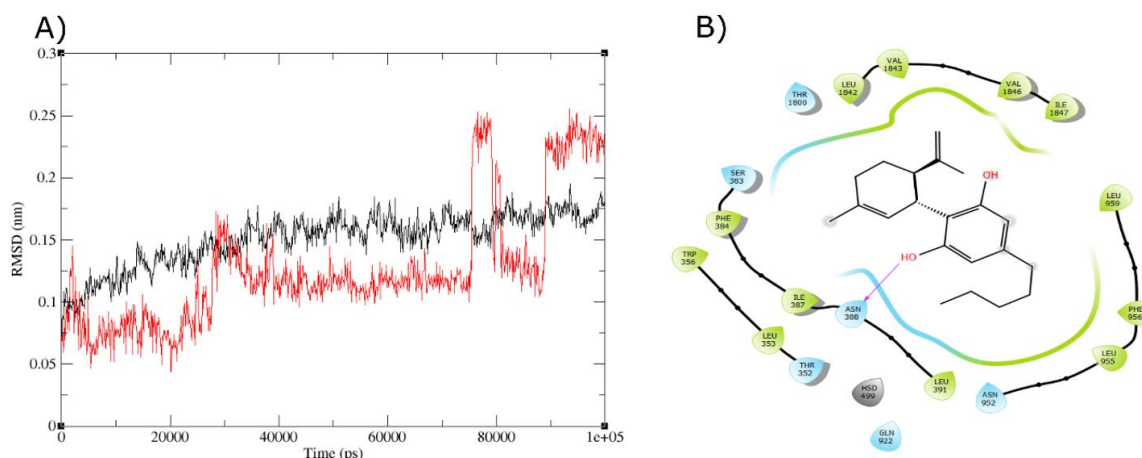


Figura 26. Cannabidiol A) Diagrama de RMSD del poro con cannabidiol. La línea roja representa el ligando y la línea negra representa el poro. B) Diagrama de interacción.

7.5.3.2 Etosuximida

El RMSD del poro nos indica que presentó movimientos durante toda la simulación de 0.1 a 0.3 nm, sin embargo, los cambios fueron menores a 0.2 nm. En relación con etosuximida, se mantuvo estable la mayor parte de la simulación, con un pequeño cambio de 0.05 nm de los 500 a los 600 ns se observaron ciertas fluctuaciones de movimiento al principio de la simulación, las cuales fueron de menos de 0.1 nm. A partir de los 30 ns se estabiliza el ligando (Figura 27A). Etosuximida presentó una interacción mediada por puente de hidrógeno con His⁴⁹⁷, residuo que se encuentra en la región citoplasmática, la cual también se pudo observar mediante acoplamiento molecular. Si bien, otras interacciones que se obtuvieron en el *docking*, desaparecieron, como con Gly¹⁴⁸⁷, este residuo sigue formando parte del ambiente químico que tiene el complejo CACNA1G-etosuximida (Figura 27B).

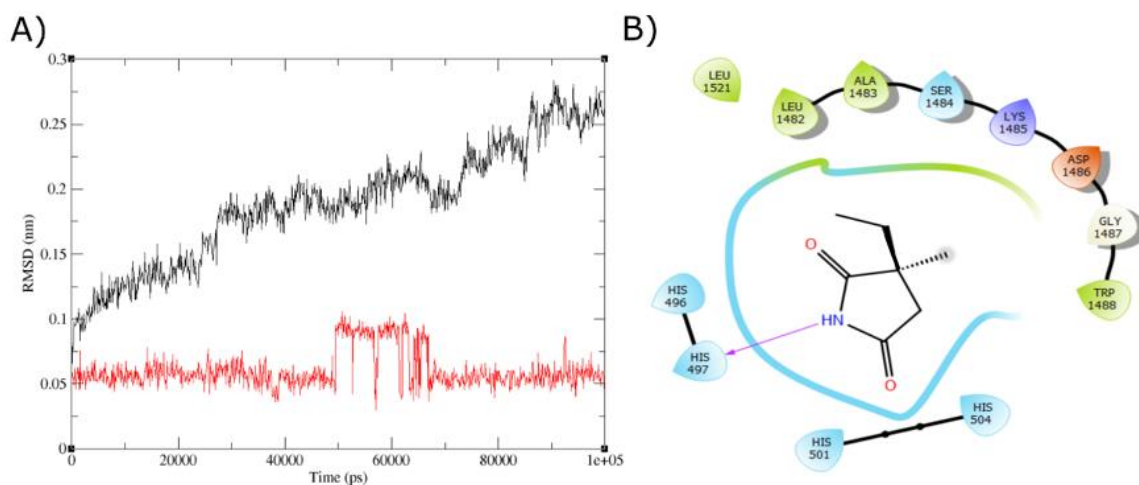


Figura 27. Etosuximida A) Diagrama de RMSD del poro con etosuximida. La línea roja representa el ligando y la línea negra representa el poro. B) Diagrama de interacción.

7.5.3.3 Metosuximida

Al evaluar el RMSD del complejo, se observó que la proteína no se estabilizó totalmente durante la simulación, mantiene ligeros cambios menores a 0.2 nm. En relación con el ligando, metosuximida se mantiene inestable durante la simulación, si bien las fluctuaciones no son muy grandes (Figura 28A). el ligando estuvo girando sobre su eje durante toda la simulación, por lo que no encontró una posición adecuada para acoplarse. Por otra parte, no se observaron interacciones en complejo después de la simulación, a diferencia del acoplamiento molecular, en donde mostraba interacciones de tipo de puente de hidrógeno con Gly¹⁴⁸⁷ y Val¹⁴⁸⁹, esto debido a que el ambiente químico que rodea al ligando cambió durante la simulación (Figura 28B). Debido a los resultados obtenidos, es necesaria una dinámica más larga de este complejo para ver si se estabiliza mejor el sistema, o bien, probar otro sitio en el cual pueda acoplarse nuestro ligando.

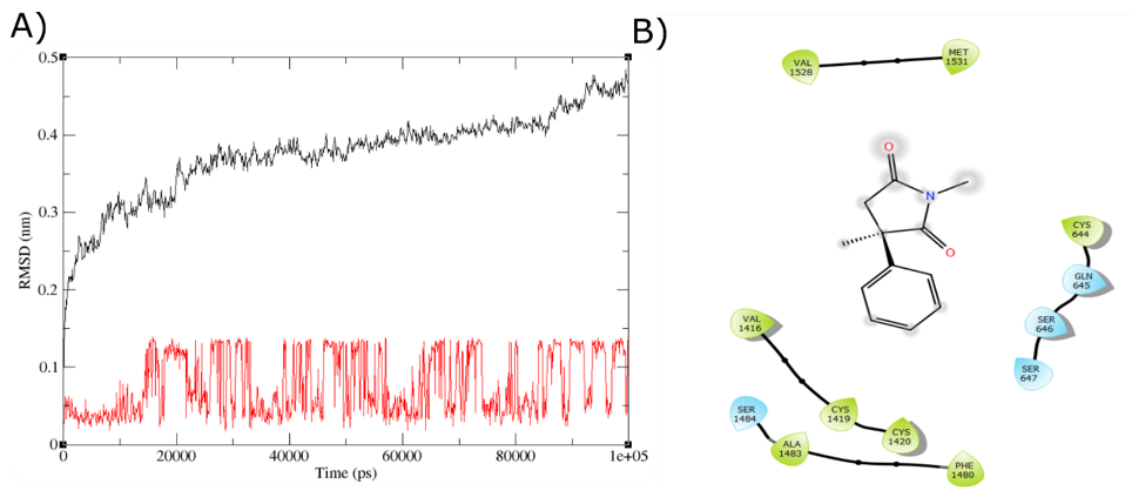


Figura 28. Metosuximida A) Diagrama de RMSD del poro con metsuximida. La línea roja representa el ligando y la línea negra representa el poro. B) Diagrama de interacción.

7.5.3.4 Flunarizina

Al evaluar el RMSD del poro se observó que la proteína se mantuvo estable durante toda la simulación, sin cambios drásticos en su movimiento, en relación con el ligando, flunarizina, se observa que se estabilizó los primeros 50 ns y posteriormente tiene un ligero cambio y se vuelve a mantener relativamente estable lo que restó de la simulación (Figura 29A). Por otra parte, se observa una interacción de tipo π - π con Phe¹⁸⁴⁰, residuo que pertenece al segmento S6 dominio IV, a diferencia del acoplamiento molecular, en donde no se observaron interacciones formales, esto debido a que el ambiente químico en el acoplamiento no era el mismo que en la dinámica y este residuo no formaba parte del él (Figura 29B).

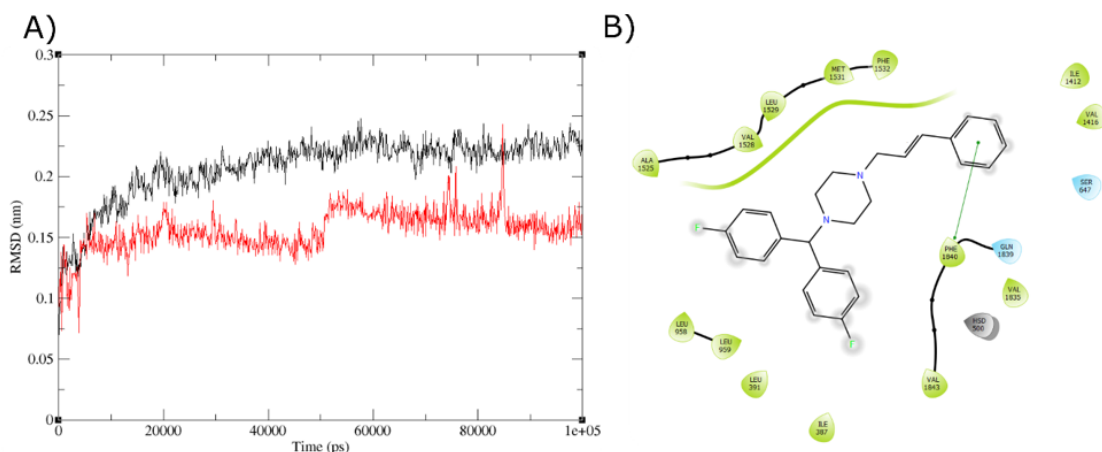


Figura 29. Flunarizina A) Diagrama de RMSD del poro con flunarizina. La línea roja representa el ligando y la línea negra representa el poro. B) Diagrama de interacción.

7.5.3.5 Trimetadiona

Durante la simulación se observó que el poro de la proteína tuvo ligeros movimientos de 0.1 nm durante toda la simulación, ya que el movimiento fue poco, no se considera relevante y podemos decir que se estabilizó. Con relación a trimetadiona, durante toda la simulación se muestra estable (Figura 30A). El complejo Trimetadiona-CACNA1G no mostró interacciones polares, sin embargo, se observa un ambiente polar alrededor del ligando, el cual podría estar involucrado en su función (Figura 30B).

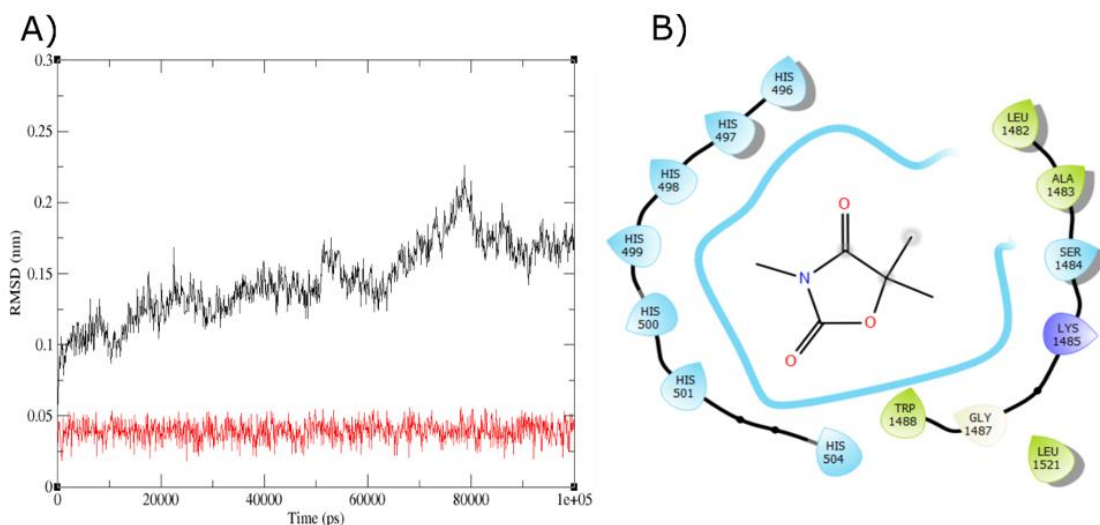


Figura 30. Trimetadiona A) Diagrama de RMSD del poro con trimetadiona. La línea roja representa el ligando y la línea negra representa el poro. B) Diagrama de interacción.

7.5.3.6 Zonisamida

El análisis del RMSD del poro muestra que la proteína se mantuvo estable durante toda la simulación, con movimientos menores a 0.2 nm. El ligando, zonisamida, logró estabilizarse durante toda la simulación (Figura 31A). En relación con las interacciones del complejo ligando-proteína se presentaron interacciones mediadas por puentes de hidrógeno con Ala¹⁴⁸³ con el hidrógeno del grupo amino y Asp¹⁴⁸⁶ y Trp¹⁴⁸⁸ con los oxígenos del carbonilo, estos residuos pertenecen a una región extracelular de CACNA1G. A comparación de las interacciones obtenidas por acoplamiento molecular, ya no se presentan las interacciones con Lys¹⁸⁴⁵ ni con His⁴⁹⁷, sin embargo, estos residuos forman parte del del ambiente químico en donde interactúa zonisamida (Figura 31B).

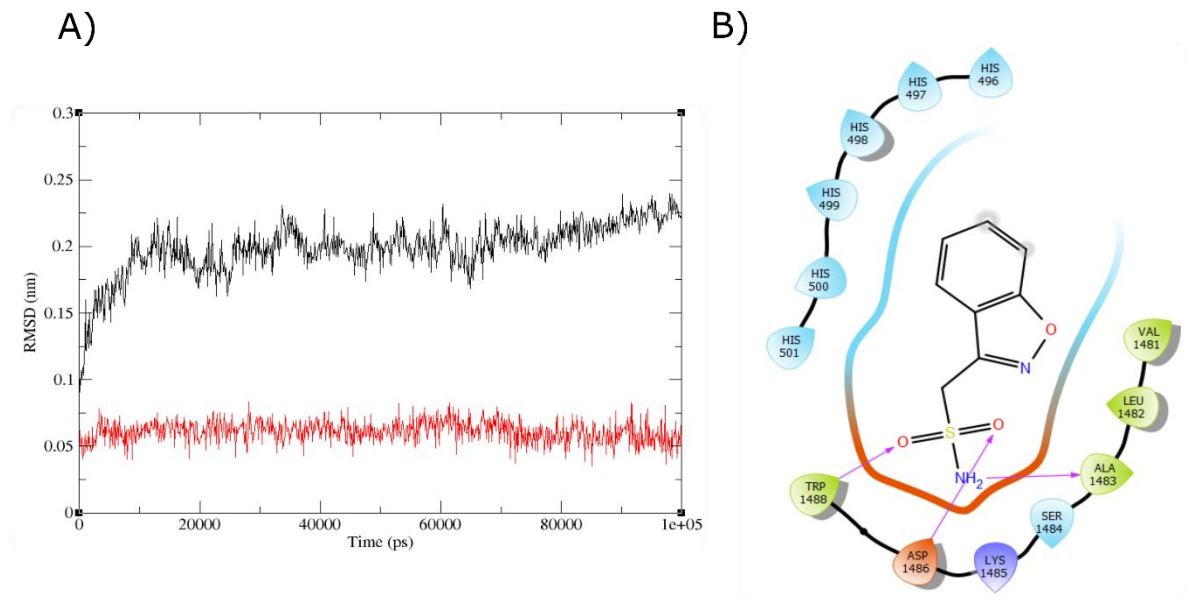


Figura 31. Zonisamida A) Diagrama de RMSD del poro con zonisamida. La línea roja representa el ligando y la línea negra representa el poro. B) Diagrama de interacción.

7.5.3.7 Levetiracetam

En el análisis de la simulación, se observó que, al principio, cerca de los 10 ns los segmentos del poro presentaron un cambio de posición de alrededor de 0.2 nm, sin embargo, después de los 10 ns se estabilizó durante el tiempo restante de simulación, al igual que el ligando, se mantuvo estable durante la simulación (Figura 32A). La estructura representativa de la simulación del complejo CACNA1G-levetiracetam-, mostró interacciones mediadas por puentes de hidrógeno con Leu¹⁴⁸² y Ser¹⁴⁸⁴ con el hidrógeno del grupo amino y con Trp¹⁴⁸⁸ con el oxígeno del carbonilo, estos residuos forman parte de un dominio topológico extracelular. Estas interacciones son diferentes a las observadas en el acoplamiento molecular, ya que la posición que toma el ligando durante la simulación es diferente, sin embargo, el ambiente químico sigue siendo el mismo (Figura 32B).

Los resultados muestran que en gran parte de los complejos se observan interacciones con residuos pertenecientes a los segmentos 6 de los dominios, esto concuerda con lo reportado por Zhao y col. (2019) en donde afirman la importancia de los segmentos VI. También se observaron interacciones con dominios topológicos extracelulares del canal, si bien, no existe información reportada sobre

este tipo de interacciones y relevancia de estos dominios en el canal, es posible que estos residuos presenten una relevancia en su actividad.

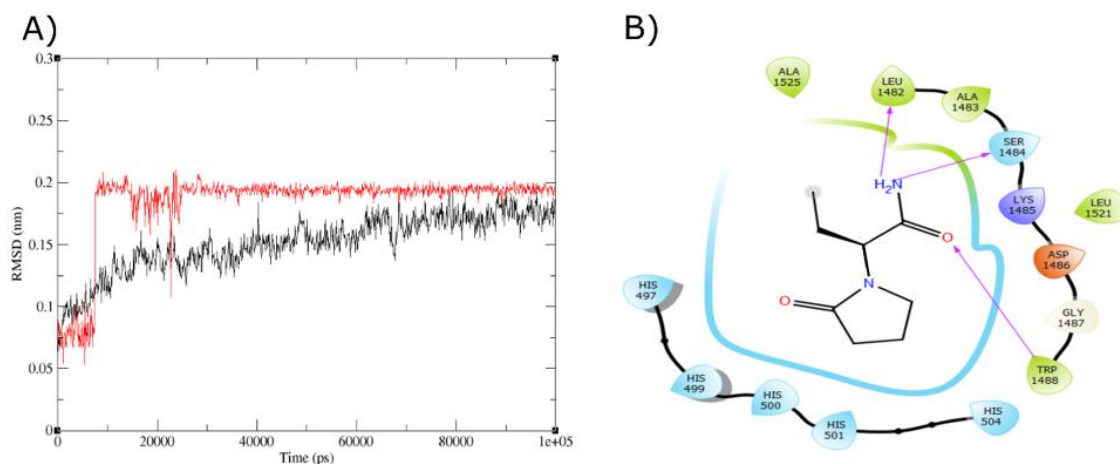


Figura 32. Levetiracetam A) Diagrama de RMSD del poro con levetiracetam. La línea roja representa el ligando y la línea negra representa el poro. B) Diagrama de interacción.

7.6 Umbrella sampling de con complejos

Posterior a la dinámica molecular, se realizó un *umbrella sampling* de 40 ns, el cual es un método de cálculo de energía libre usado para explorar el proceso de disociación de los sistemas ligando-proteína y calcular la energía de unión (You, et al., 2019), obteniendo también la *r* de Pearson, la cual nos muestra qué tanto se adecua el perfil *umbrella* calculado con la curva sigmoidea ideal de un proceso *umbrella*. Los histogramas y gráficos de potencial *umbrella* se encuentran en el anexo VI.

Se observó que el control positivo, Z944, mostró una energía de unión de -148.38 kcal/mol, lo cual indica que tiene una buena afinidad teórica al sitio de unión, ya que es el inhibidor selectivo del canal (Zhao, et al., 2019), este resultado corrobora su alta afinidad y selectividad. Los controles negativos, mefenitoina y brivaracetam, mostraron una energía de unión de -17.45 kcal/mol y -17.27 kcal/mol, respectivamente. Ya que nuestros controles negativos se unen a canal de sodio y a

SV2A (Zona, et al., 2010; Lenkowski, et al 2004), tiene sentido que su afinidad a este canal sea baja en comparación con el control positivo. Estos valores de afinidad nos servirán de referencia para evaluar los fármacos seleccionados.

Flunarizina, levetiracetam y cannabidiol presentaron los valores más altos en energía de unión, con un valor de -98.93 kcal/mol, -91.64 kcal/mol y -74.39 kcal/mol, respectivamente. Estos valores estuvieron por debajo del valor de z944, por lo cual indicarían una buena afinidad a CACNA1G. Con valores de -29.77 kcal/mol y -25.77 kcal/mol se encontró a zonisamida y trimetadiona, respectivamente. Esto indica que, si bien, se unen a la proteína de interés, su afinidad no es tan alta. Con un menor valor de energía de unión se encontró a etosuximida y metosuximida, con valores de -9.79 y -9.78 kcal/mol, respectivamente. Estos valores se encuentran por debajo de los valores obtenidos de los controles negativos. Si bien, esto podría indicar que tienen una muy baja afinidad a CACNA1G, estos fármacos son recetados de primera línea para el tratamiento de epilepsia de ausencia, tipo de epilepsia en la que está involucrada este canal, y presenta una tasa de respuesta cerca de 90% (Martinez-Ferrández. et al., 2019), por lo cual, otra posible explicación para estos bajos valores de energía de unión podría deberse a que las coordenadas utilizadas para el *docking* y la dinámica ligando-proteína no son las adecuadas para estos ligandos, en otras palabras, que no es el sitio de unión de las succinimidas, aunque no está reportado un sitio de unión específico de etosuximida y metosuximida. En el caso de los otros fármacos, zonisamida y trimetadiona, los resultados indican una baja especificidad, sin embargo, también podrían tener otro sitio de unión. Es necesario explorar diferentes posibles sitios de unión, ya que el sitio estudiado se basó específicamente en las coordenadas reportadas de la cristalografía del complejo con el inhibidor z944, la cual no descarta la posibilidad de diferentes sitios de unión de los fármacos. Otros posibles sitios de unión pudieran involucrar los segmentos S4, los cuales contienen cargas de activación, que detectan cambios en el campo eléctrico e inician los cambios conformacionales que abren el poro, ya que los cambios en el potencial de membrana impulsan el segmento S4 hacia dentro y

hacia fuera en respuesta a la hiperpolarización y despolarización, por lo cual buscar sitios de unión cercanos a los S4 sugieren otro posible enfoque (Catteral, et al., 2020).

Tabla 13. Valores de energía de unión de los complejos ligando-proteína

Sistema	Energía (kcal/mol)	r Pearson
CACNA1G-z944	-148.39	0.9964
CACNA1G-MEFENITOINA	-17.46	0.9493
CACNA1G-BRIVARACETAM	-17.27	0.9699
CACNA1G-FLUNARIZINA	-98.94	0.9982
CACNA1G-LEVETIRACETAM	-91.64	0.9861
CACNA1G-CANNABIDIOL	-74.40	0.9911
CACNA1G-ZONISAMIDA	-29.78	0.9899
CACNA1G-TRIMETADIONA	-25.54	0.9525
CACNA1G-ETOSUXIMIDA	-9.80	0.9012
CACNA1G-METOSUXIMIDA	-9.78	0.9717

8. Conclusiones

- El modelado por homología del canal de calcio dependiente de voltaje de tipo T alfa 1G, obtenido mediante el servidor I-TASSER, después de una dinámica de relajación de 200 ns, mejoró su geometría, cumpliendo con los criterios de calidad obtenidos del servidor web MolProbity, los cuales pudimos observar mediante los residuos favorecidos y nos indicaron que nuestro modelo era confiable.
- Los diferentes iones en el sistema, KCl, CaCl₂ y NaCl, mostraron diferencia significativa sólo entre CaCl₂ y NaCl, en los demás sistemas no se logró observar una influencia de los cationes en la apertura del poro del canal a nivel de simulación; sin embargo, es necesario obtener más *frames* para realizar el análisis. Los programas y servidores web considerados mostraron limitaciones para medir el volumen del poro de CACNA1G debido, probablemente, al tamaño de la proteína a evaluar.
- Los acoplamientos moleculares con los fármacos anticonvulsivos seleccionados permitieron observar las interacciones de los complejos ligando-proteína y corroborar que el sitio de unión que analizamos, para z944, era correcto; sin embargo, no es así para los demás ligandos.
- CACNA1G en complejo con los ligandos seleccionados presenta interacciones que parecen ser relevantes para su actividad anticonvulsiva con Asp⁹²⁴, His⁴⁹⁷, Trp¹⁴⁸³ Y Trp¹⁴⁸⁸, por lo que compuestos que favorezcan interacciones con estos aminoácidos podrían tener un potencial anticonvulsivo por unión a este canal.
- Flunarizina, levetiracetam y cannabidiol presentan una buena energía de unión, superior a zonisamida, trimetadiona, etosuximida y metosuximida, lo

cual indicó una buena afinidad relativa con esos complejos, obteniendo conformaciones más estables.

- Las succinimidas presentan una baja afinidad teórica, por lo que se pudiera suponer que el sitio de unión de estas no es el mismo que el de los demás fármacos probados.
- Zonisamida y trimetadiona mostraron una afinidad media en relación con la obtenida con los otros complejos, lo que indica que su unión no es específica y que es necesario probar otros posibles sitios de unión.

9. Perspectivas

Es necesario complementar la información obtenida con algunos estudios como:

- Realizar un análisis comparativo usando diferentes servidores para evaluar si el volumen del poro de CACNA1G está influenciado por el tipo de iones que se encuentran en el sistema.
- Realizar un *docking ciego* de CACNA1G con todos los anticonvulsivos probados, con la finalidad de observar si existen otro sitio de unión posible.
- Debido a que levetiracetam presentó un buen valor de afinidad teórica, realizar un acoplamiento y dinámica molecular y *umbrella sampling* de los compuestos análogos a levetiracetam que se encuentran en la base de datos del laboratorio de Diseño Asistido por Computadora y Síntesis de Fármacos (DACSIF), con la intención de evaluar si estas moléculas también muestran una buena energía de unión y, por ende, una posible diana biológica adicional a SV2A, proteína para la cual fueron diseñados, dando un perfil de afinidad similar a levetiracetam.
- Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, realizar un análisis QSAR para hacer una predicción teórica de la actividad biológica que permita el diseño teórico de posibles moléculas con potencial farmacológico.

10. REFERENCIAS

Aguilera-Durán, G. Estudio computacional de blancos moleculares relevantes en vitiligo: activación de los receptores cxcr3 y cxcr6, y modulación alostérica de la tirosinasa. Tesis doctorado. Universidad Autónoma de Querétaro. **2021**.

Aguilera-Durán, G y Romo-Mancillas, A. CA. Behavior of Chemokine Receptor 6 (CXCR6) in Complex with CXCL16 Soluble form Chemokine by Molecular Dynamic Simulations: General Protein–Ligand Interaction Model and 3D-QSAR Studies of Synthetic Antagonists. *Life*. **2021**; 11 , 346. <https://doi.org/10.3390/life11040346>

Bajusz, D., Rácz, A., & Héberger, K. Why is Tanimoto index an appropriate choice for fingerprint-based similarity calculations?. *Journal of cheminformatics*, **2015**; 7(1), 1-13.

Ballón-Paucara, W y Grados-Torrez, R. Acoplamiento molecular: criterios prácticos para la selección de ligandos biológicamente activos e identificación de nuevos blancos terapéuticos. *Revista CON-CIENCIA*, **2019**;7(2), 55–72.

Beghi, E The Epidemiology of Epilepsy. *Neuroepidemiology*, **2020**;54(2), 185–191. <https://doi.org/10.1159/000503831>

Berka, K., Hanak, O., Sehnal, D., Banaš, P., Navrátilová, V., Jaiswal, D., Ționescu, C.-M., Svobodová, V., Vařeková, R., Koca, J. and Otyepka, M. MOLEonline 2.0: interactive web-based analysis of biomacromolecular channels. *Nucleic Acids Res*, **2012**; 40, W222–W227

Brezovsky, J., Chovancova, E., Gora, A., Pavelka, A., Biedermannova, L., and Damborsky, J. Software tools for identification, visualization and analysis of protein tunnels and channels. *Biotechnology advances*, 2013; 31(1), 38-49. Doi:10.1016/j.biotechadv.2012.02.002

Cain S y Snutch, T. Voltage-gated calcium channels in epilepsy. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies [Internet]. 4th Edition. 2012*

Casillas-Espinosa, P. M., Shultz, S. R., Braine, E. L., Jones, N. C., Snutch, T. P., Powell, K. L., & O'Brien, T. J. Disease-modifying effects of a novel T-type calcium

channel antagonist, Z944, in a model of temporal lobe epilepsy. *Progress in Neurobiology*. **2019**; 182, 101677.

Catterall, W. A., Lenaeus, M. J., & Gamal El-Din, T. M. Structure and pharmacology of voltage-gated sodium and calcium channels. *Annual review of pharmacology and toxicology*, **2020**; 60, 133-154.

Chen, Y., Lu, J., Zhang, Y., Pan, H., Wu, H., Xu, K., Liu, X., Jiang, Y., Bao, X., Zhou, J., Liu, W., Shi, G., Shen, Y., & Wu, X. T-type calcium channel gene alpha (1G) is not associated with childhood absence epilepsy in the Chinese Han population. *Neuroscience Letters*, **2003**;341(1), 29–32. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(03\)00124-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(03)00124-1)

Cuzick, J. A Wilcoxon-type test for trend. *Statistics in medicine*, **1985**; 4(1), 87-90.

De Jong, D., Singh, G., Bennett, W., Arnarez, C., Wassenaar, T. A., Schafer, L. V., & Marrink, S.. Improved parameters for the martini coarse-grained protein force field. *Journal of chemical theory and computation*. **2013**; 9(1), 687-697.

Daura, X., Gademann, K.; Jaún, B.; Seebach, D.; van Gunsteren, WF; Mark, AE Plegamiento de péptidos: cuando la simulación se encuentra con el experimento. *Angew. química En t. ed.* **1999**; 38 , 236–240

Espinosa-Jovel, C. Cannabinoids in epilepsy: Clinical efficacy and pharmacological considerations. *Neurologia (English Edition)*. **2020**. ISSN 2173-5808 2-7. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2020.02.005>

Gambardella, A y Labate, A. The role of calcium channel mutations in human epilepsy. In *Progress in Brain Research* (1st ed., Vol. 213, Issue C). Elsevier B.V. **2014** <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63326-2.00004-1>

González-Medina M, Prieto-Martínez FD, Owen JR, Medina-Franco JL. Gráficos de diversidad de consenso: un análisis de diversidad global de bibliotecas químicas. *Diario de Cheminformatics* 2016, 8, 63. <https://doi.org/10.1186/s13321-016-0176-9>

Greenacre, M., Groenen, P. J., Hastie, T., d'Enza, A. I., Markos, A., & Tuzhilina, E.. Principal component analysis. *Nature Reviews Methods Primers*. **2020**; 2(1), 100.

Herman, M y Moreno, C. B. Transmisión sináptica-canales de calcio y liberación de neurotransmisores. *Revista Ciencias de La Salud*, **2005**;3, 47–61.

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-72732005000100006&nrm=iso

Herrera-Vázquez, O., Toledo Rojas, A., y Fleury, A. Neuroinflamación y epilepsia. *TIP. Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, **2016**; 19(1), 24–31.

Hillisch, A y Pineda, L. F. y H. R. Utilidad de los modelos de homología en el proceso de descubrimiento de fármacos. *Drug Discovery Today*. **2021**.

Hoof-rob, W y van Eijck, B. P. y K. J. Un procedimiento de muestreo de paraguas adaptativo en análisis conformacional usando dinámica molecular y su aplicación al glicol. *The Journal of Chemical Physics*. **1998**.

Humphrey, W., Dalke, A. y Schulten, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics", *J. Molec. Graphics*, **1996**; 14, 33-38.

Ibeas Bih, C., Chen, T., Nunn, A. V., Bazelot, M., Dallas, M., & Whalley, B. J. Molecular targets of cannabidiol in neurological disorders. *Neurotherapeutics*. **2015**; 12, 699-730.

Iftinca-Mircea, C y Zamponi, G. W. Regulación de los canales de calcio neuronales de tipo T. *Tendencias En Ciencias Farmacológicas*. **2019**.

Jha, P., Chaturvedi, S., Swastika., Pal, S., Jain, N., Mishra, A.K. Improving 5-HT₇ R homology model for design of high affinity ligands: model validation with docking, embrace minimization, MM-GBSA, and molecular dynamic simulations. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2018**. 36, 2475–2494, doi:10.1080/07391102.2017.1359907.

Kastner, J. Muestra de paraguas. *Wiley Interdiscipline Reviews: Computational Molecular Science*. **2011**.

Kolar, M. H., & Hobza, P. Computer modeling of halogen bonds and other σ -hole interactions. *Chemical reviews*. **2016**; 116(9), 5155-5187.

Lenkowski, P. W., Ko, S. H., Anderson, J. D., Brown, M. L., & Patel, M. K. Block of human NaV1.5 sodium channels by novel α -hydroxyphenylamide analogues of phenytoin. *European journal of pharmaceutical sciences*. **2004**; 21(5), 635-644.

López-González, R., y Bibliográfica, R. Epilepsia, tratamiento farmacológico y su monitoreo epilepsy, pharmacological treatment and monitoring. *Revista Cúpula*. 2016. 30(2), 44-53.

- López-Meraz, M**, Rocha, L., Miquel, M., Hernández, M. E., Cárdenas, R. T., Coria-Ávila, G. A., García, L. I., Estudillo, C. A. P., Abreu, G. E. A., y Manzo, J. Conceptos básicos de la epilepsia. *Revista Médica de La Universidad Veracruzana*, **2009**;9(2), 31–37.
- Lozano-Aponte, J.**, y Scior, T. ¿Qué sabe Ud. Acerca de... Dinámica Molecular? *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, **2014**;45(1), 86–88.
- Málaga, I.**, Sánchez-Carpintero, R., Roldán, S., Ramos-Lizana, J., y García-Peñas, J. New anti-epileptic drugs in Paediatrics. *Anales de Pediatría*, **2019**;91(6). <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2019.09.008>
- Mantegazza, M y** Catterall, W. A. Voltage-Gated Na⁺ Channels. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies [Internet]. 4th Edition. 2012.*
- Martínez-Ferrández, C.**, Martínez-Salcedo, E., Casas-Fernández, C., Alarcón-Martínez, H., Ibáñez-Micó, S., & Domingo-Jiménez, R. Epilepsia ausencia infantil. Pronóstico a largo plazo. *Neurología*, **2019**; 34(4), 224-228.
- McLaughlin MJ**, Sainani KL. Bonferroni, Holm and Hochberg corrections: fun names, serious changes to p values. *PM R*. **2014**;6:544-6
- McKight, P. E.**, y Najab, J. Kruskal-wallis test. *The corsini encyclopedia of psychology*, **2010**; 1-1.
- Mitsutake, A y** Takano, H. Relaxation mode analysis for molecular dynamics simulations of proteins. *Biophysical Reviews*, **2018**;10(2), 375–389. <https://doi.org/10.1007/s12551-018-0406-7>
- Moshé, S.**, Perucca, E., Ryvlin, P., y Tomson, T. Epilepsy: New advances. *The Lancet*, **2015**;385(9971), 884–898. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60456-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60456-6)
- Noebels-Jeffrey, L.**, Avoli, M., R. M. A., O. R. W. y D.-E. A. V. *Mecanismos básicos de las epilepsias de Jasper [internet]. 2012.*
- Noriega-Morales, G.**, y Shkurovich-Bialik, P. Situación de la epilepsia en México y América Latina. *Anales Médicos de La Asociación Médica Del Centro Médico ABC*, **2020**;65(3), 224–232. <https://doi.org/10.35366/95680>
- Morris, G.M.**; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K.; Goodsell, D.S.; Olson, A.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective

receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, 30, 2785–2791

Pagadala-Nataraj, S y Syed, K. y T. J. Software para acoplamiento molecular: una revisión. *Reseñas Biofísicas*. **2017**.

Pérez, J. El modelado molecular: una herramienta para la mejora y obtención de nuevos fármacos. *FarmaJournal*, **2017**;2(1), 141–142.

Periole, X., Cavalli, M., & Marrink, S. Combining an elastic network with a coarse-grained molecular force field: Structure, dynamics, and intermolecular recognition. *The Journal of Physical Chemistry B*- **2009**; 113(8), 11-18. <https://doi.org/10.1021/jp804864q>

Phatak-Sharangdhar S., Stephan, C., Cayasotto, C. High-throughput and in silico screenings in drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*. **2009**: 4(9), 947-959.

Press, O. Canales de potasio (incluido KCNQ) y epilepsia. *Mecanismos Básicos de Las Epilepsias de Jasper*. **2012**.

Prieto-Martínez, F., y Medina-Franco, J. L. Diseño de fármacos asistido por computadora: cuando la informática, la química y el arte se encuentran. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*. **2019**;21(2), 124–134.

Pulido-Fontes, L., Quesada Jiménez, P., Mendioroz Iriarte, M. Epigenética y epilepsia. *Neurología*, **2015**;30(2), 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2014.03.012>

Politzer, P., Murray, JS y Clark, T. Enlace halógeno y otras interacciones σ -agujero: una perspectiva. *Física Química Química Física*. **2013**; 15 (27), 11178-11189.

Royston, P. Approximating the Shapiro-Wilk W-test for non-normality. *Statistics and computing*, **1992**; 2, 117-119.

Saldívar-González, F., Prieto-Martínez, F. D., y Medina-Franco, J. L. Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educación Química*, **2017**;28(1), 51–58.

Schrödinger Release 2021-3: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, **2021**.

Servando-Medel M. J., Rafael Ramos Morales, F., Correa Basurto, J., Samuel Cruz Sánchez, J., Virginia Saavedra Vélez, M., Velásquez Melgarejo, V., Clínico, Q., y en Ciencias, M. Participation of voltage-dependent calcium channels in the development of epilepsy Palabras clave: epilepsia * canales de calcio * crisis convulsivas * epilepto-génesis * foco epiléptico * anticonvulsivantes. *Acta Bioquím Clín Latinoam*, **2010**;44(3), 329–335.

Singh, B., Monteil, A., Bidaud, I., Sugimoto, Y., Suzuki, T., Hamano, S. ichiro, Oguni, H., Osawa, M., Alonso, M. E., Delgado-Escueta, A. V., Inoue, Y., Yasui-Furukori, N., Kaneko, S., Lory, P., y Yamakawa, K. Mutational analysis of CACNA1G in idiopathic generalized epilepsy. Mutation in brief #962. Online. *Human Mutation*, **2007**;28(5), 524–525. <https://doi.org/10.1002/humu.9491>

Soldovieri, M., Boutry-Kryza, N., Milh, M., Doummar, D., Heron, B., Bourel, E., y Lesca, G. Novel KCNQ 2 and KCNQ 3 Mutations in a Large Cohort of Families with Benign Neonatal Epilepsy: First Evidence for an Altered Channel Regulation by Syntaxin-1 A. *Human mutation*. **2014**. 35(3), 356-367.

Smart, O.S., Neduelil, J.G., Wang, X., Wallace, B.A. and Sansom, M.S.P. HOLE: a program for the analysis of the pore dimensions of ion channel structural models. *J. Mol. Graph.*, **1996**; 14, 354–360.

Stafstrom, C y Carmant, L. Convulsiones y epilepsia: una descripción general para neurocientíficos. *Perspectivas de Cold Spring Harbor En Medicina*. **2015**.

Steinlein, O. Calcium signaling and epilepsy. *Cell and Tissue Research*, **2014**;357(2), 385–393. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1849-1>

Tang, J., Maximov, A., Shin, O. H., Dai, H., Rizo, J., y Südhof, T. C. A complexin/synaptotagmin 1 switch controls fast synaptic vesicle exocytosis. *Cell*. **2006**. 126(6), 1175-1187

The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* 49:D1. **2021**.

Velásquez, M., Drosos, J., Gueto, C., Márquez, J., y Vivas-Reyes, R. Método acoplado Autodock-PM6 para seleccionar la mejor pose en estudios de Acoplamiento Molecular. *Revista Colombiana de Química*, **2013**.

Vidaurre, J., & Herbst, J. *ARTÍCULO ESPECIAL NUEVOS FÁRMACOS ANTIÉPILEPTICOS* **2019**;79, 48–53.

Wagner, J. R., Sørensen, J., Hensley, N., Wong, C., Zhu, C., Perison, T., y Amaro, R. E. POVME 3.0: software for mapping binding pocket flexibility. *Journal of chemical theory and computation*, **2017**; 13(9), 4584-4592.

Wang, G., Bochorishvili, G., Chen, Y., Salvati, K. A., Zhang, P., Dubel, S. J., y Zhu, J. J. CaV3. 2 calcium channels control NMDA receptor-mediated transmission: a new mechanism for absence epilepsy. *Genes & development*. **2013**; 29(14), 1535-1551.

Wishart, D., Knox, C., Guo, A. C., Shrivastava, S., Hassanali, M., Stothard, P., y Woolsey, J. DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic acids research*. **2006**; 34(suppl_1), D668-D672.

Yacubian, E. Evolução da terapêutica medicamentosa das epilepsias. *Medicamentoso Epilepsias*. **2014**;51.

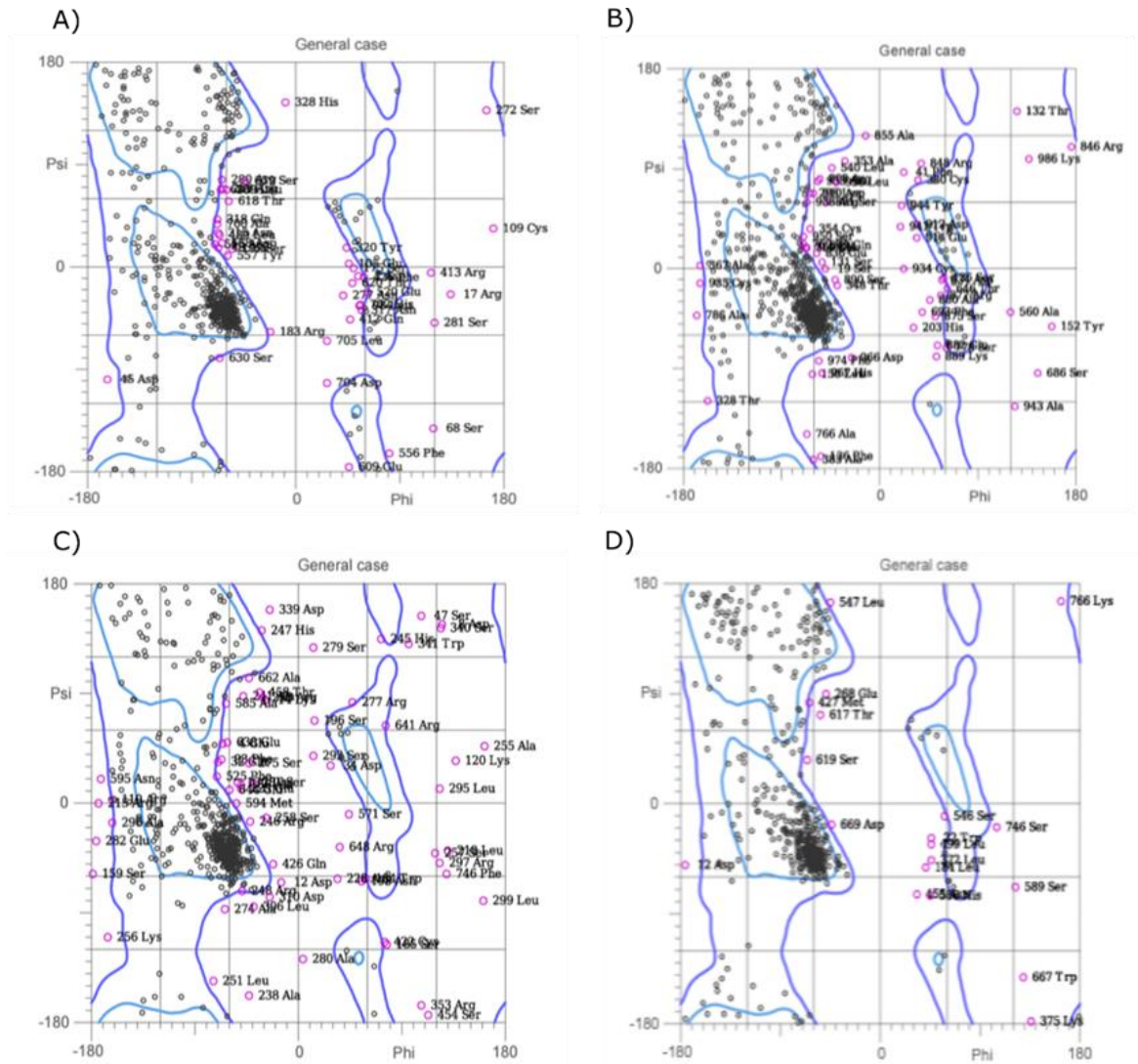
You, W., Tang, Z., & Chang, C. E. A. Potential mean force from umbrella sampling simulations: What can we learn and what is missed?. *Journal of chemical theory and computation*, **2019**;15(4), 2433-2443.

Zhao, Y., Huang, G., Wu, Q., Wu, K., Li, R., Lei, J., Pan, X., & Yan, N. Cryo-EM structures of apo and antagonist-bound human Ca v 3.1. *Nature*, **2019**;576(7787), 492–497.

Zona, C., Pieri, M., Carunchio, I., Curcio, L., Klitgaard, H., & Margineanu, D. G. Brivaracetam (ucb 34714) inhibits Na⁺ current in rat cortical neurons in culture. *Epilepsy research*. **2010**; 88(1), 46-54.

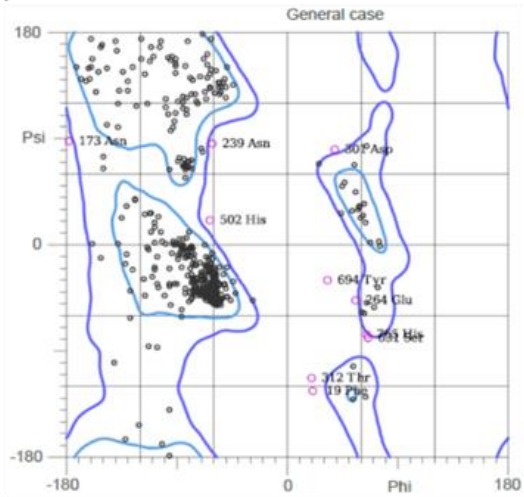
11. ANEXOS

Anexo I. Diagramas de Ramachandran de los modelos obtenidos en los diferentes servidores.

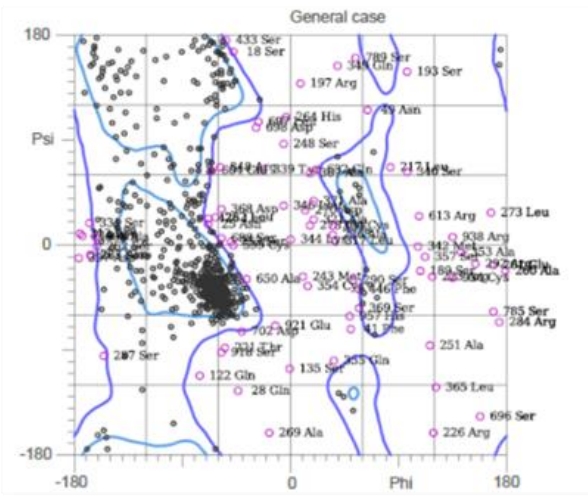


Diagramas de Ramachandran de los segmentos modelados por ITASSER. A) Segmento 1. B) Segmento 2 C) Segmento 3. D) segmento 4.

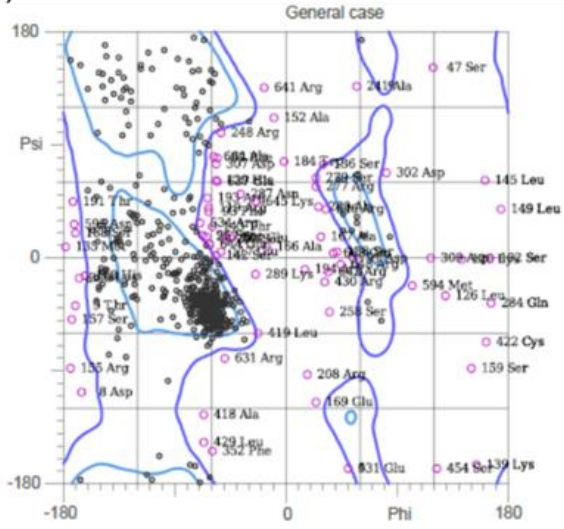
A)



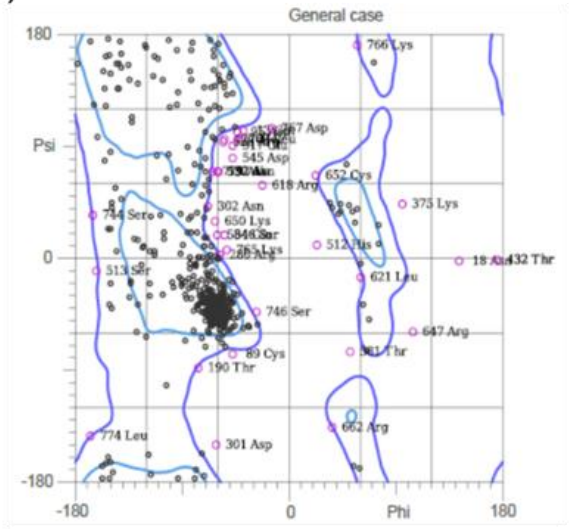
B)



C)



D)



Diagramas de Ramachandran de los segmentos modelados por Robetta A) Segmento 1. B) Segmento 2 C) Segmento 3. D) segmento 4.

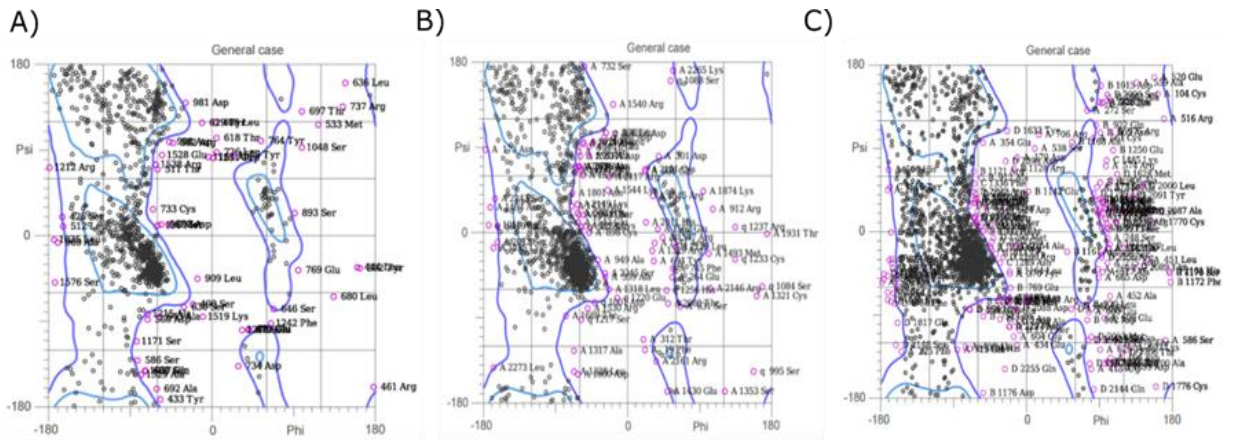
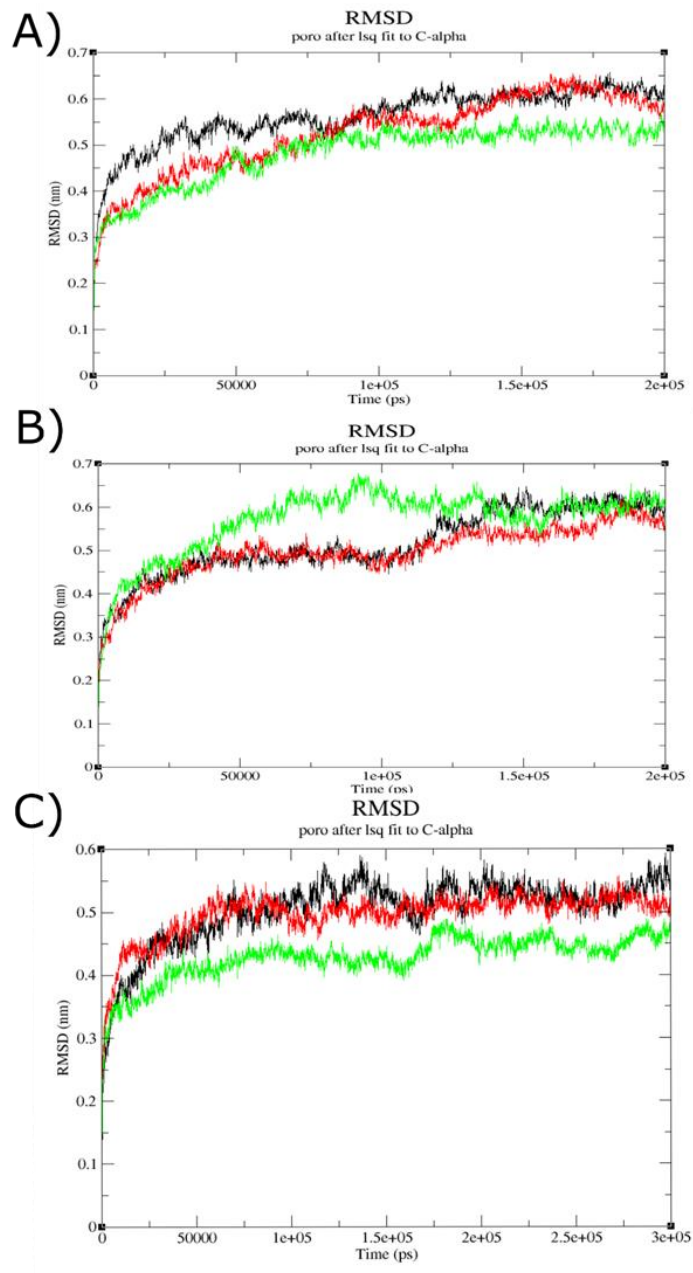
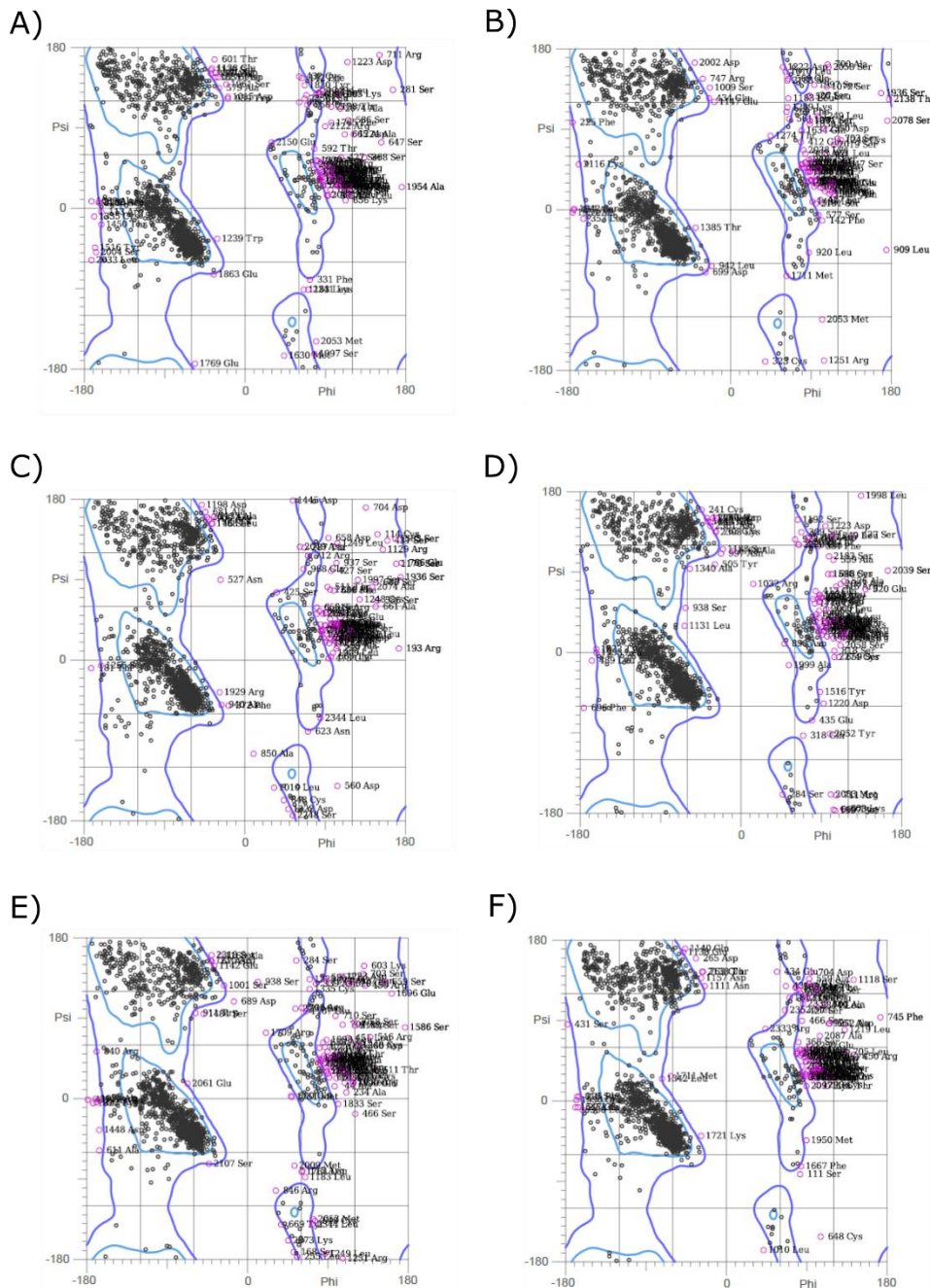


Diagrama de Ramachandran los modelos completos. A) por homología obtenido por *Swiss model* B) Modelo quimera usando los segmentos obtenidos de Robetta C) Modelo quimera usando los segmentos obtenidos de ITASSER.

Anexo II. Análisis del RMSD de la trayectoria de AA-MD



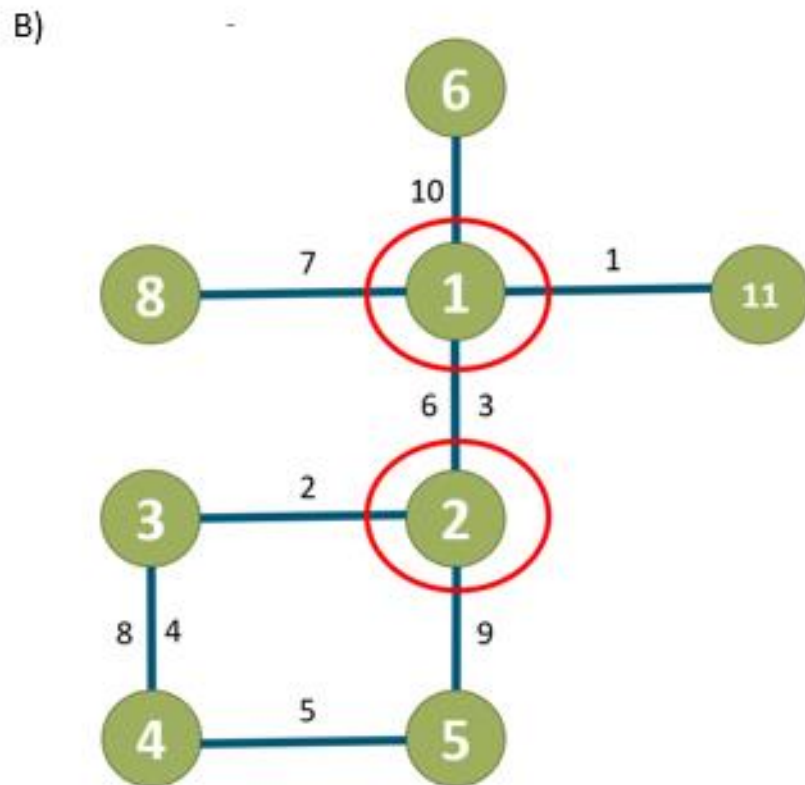
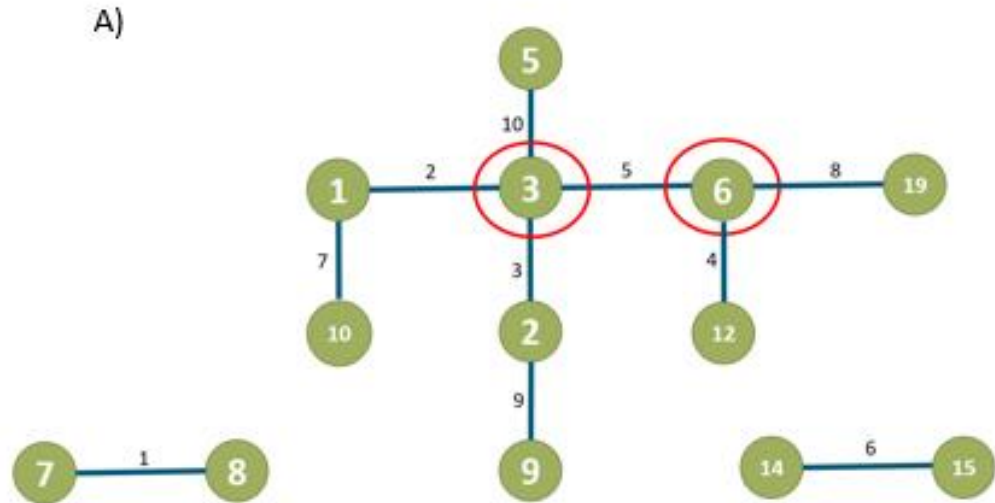
RMSD del poro por triplicado. A) En un sistema de CaCl_2 B) En un sistema de KCl C) Sistema de NaCl . El color negro indica MD1, rojo MD2 y verde MD3

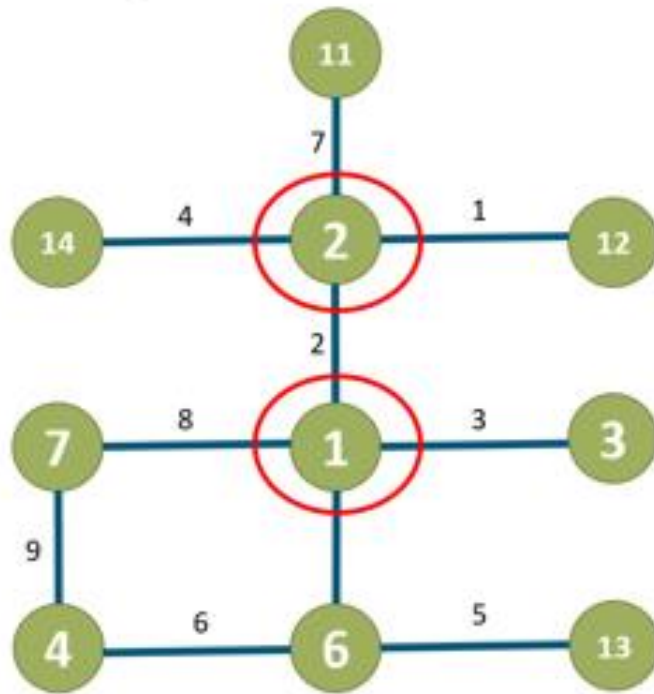


Anexo II. Diagrama de Ramachandran de los clústeres seleccionados después de las AA-MD

Diagramas de Ramachandran de los clústeres seleccionados obtenidos de los diferentes sistemas. A) Clúster 1 del sistema CaCl_2 . B) Clúster 2 del sistema CaCl_2 . C) Clúster 1 del sistema KCl. D) Clúster 2 del sistema KCl. E) Clúster 1 del sistema NaCl. F) Clúster 2 del sistema NaCl.

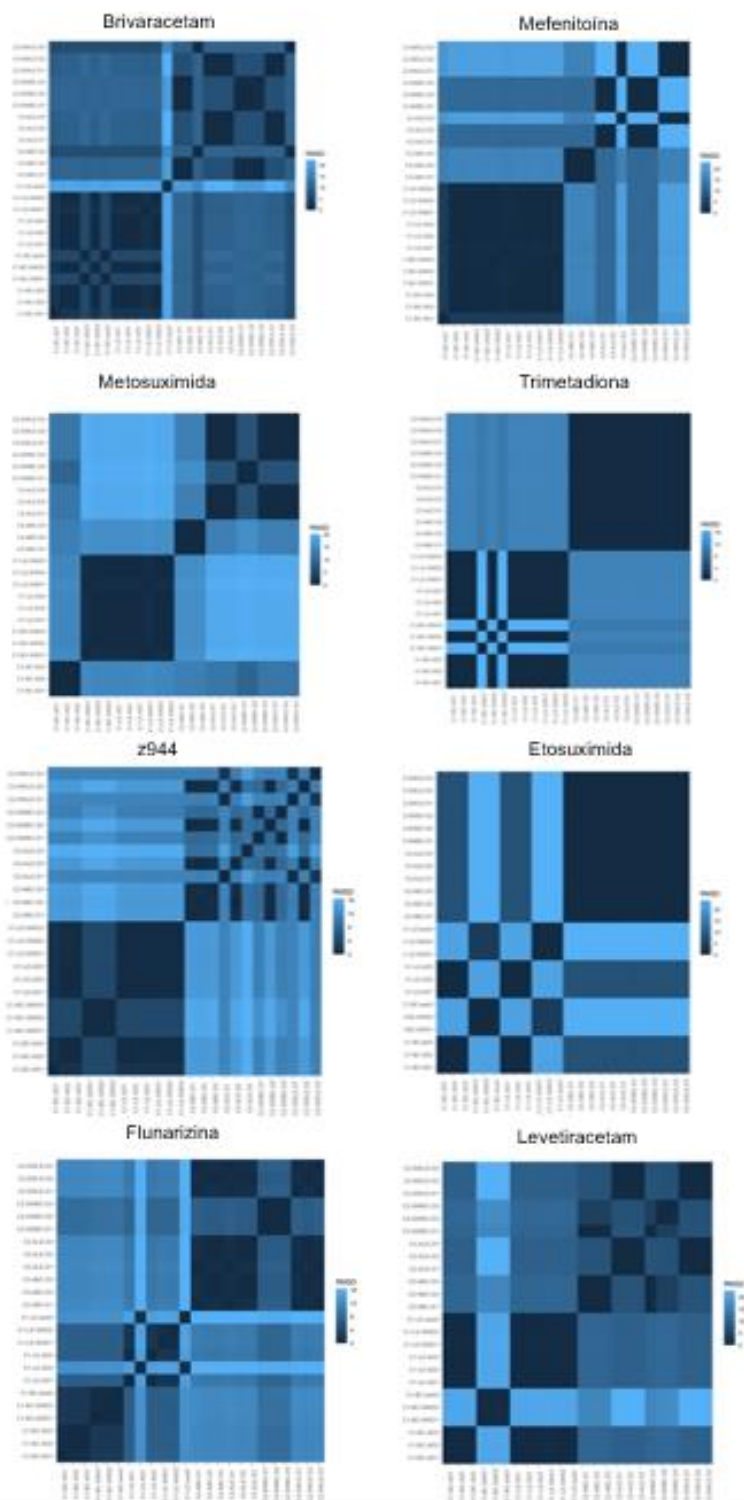
Anexo III. Diagramas eigenvectores-clusters de los sistemas obtenidos por Análisis de Componentes Principales



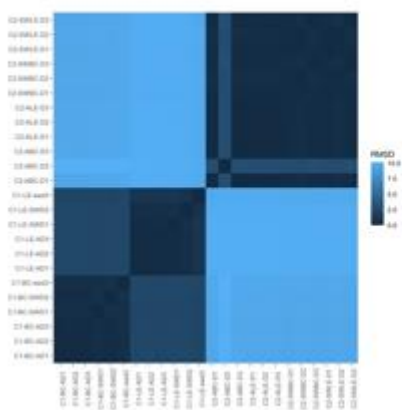


Anexo III. A) Sistema NaCl. B) Sistema KCl. C) Sistema CaCl₂.

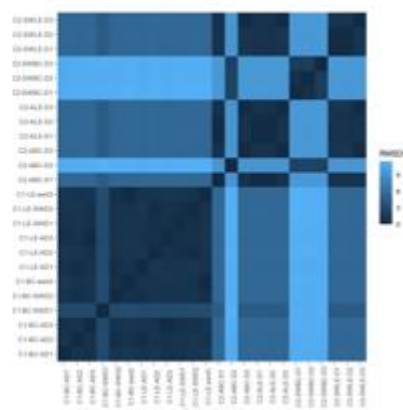
Anexo III. Matrices de correlación de RMSD entre las conformaciones LE y BC, considerando los algoritmos de búsqueda Solis-Wets y ADADELTA



Zonisamida

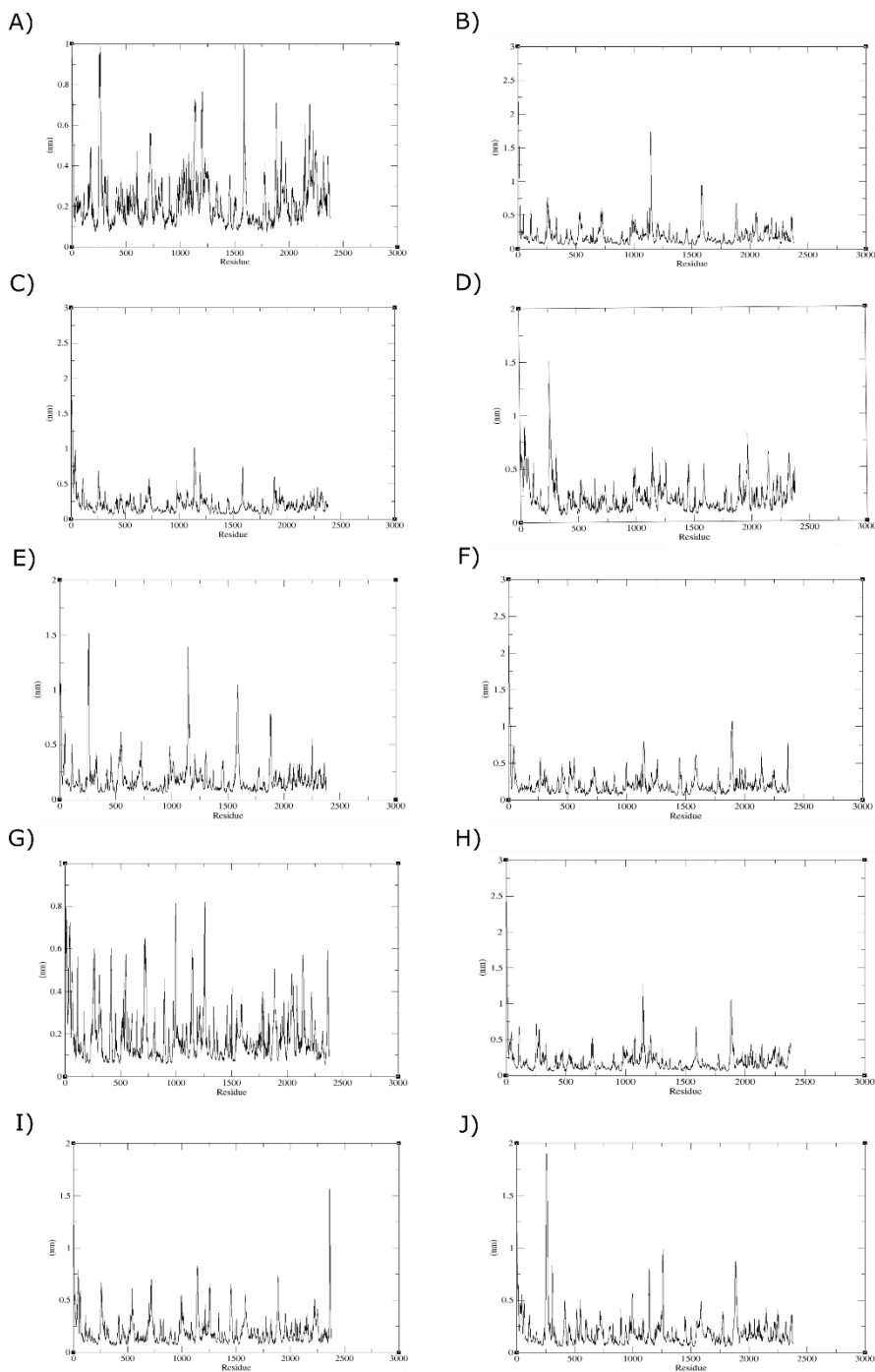


Cannabidiol



Matrices de correlación de RMSD obtenidas de las conformaciones LE Y BC de los acoplamientos moleculares.

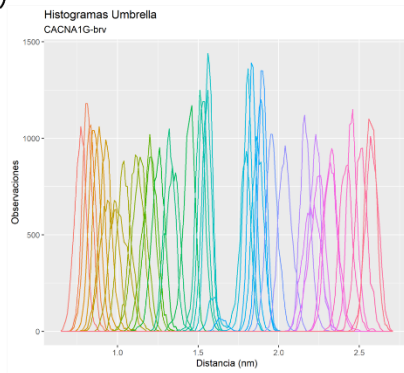
Anexo IV. RMSF de las dinámicas de todos los complejos ligando-proteína.



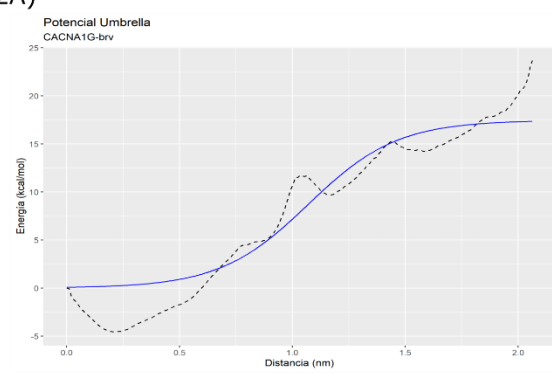
RMSF de las dinámicas de los complejos. A) brivaracetam. B) cannabidiol C) etosuximida D) flunarizina. E) levetiracetam F) mefenitoina G) metosuximida H) trimetadiona I) z944 J) Zonisamida

Anexo V. Histogramas de los perfiles *umbrella*

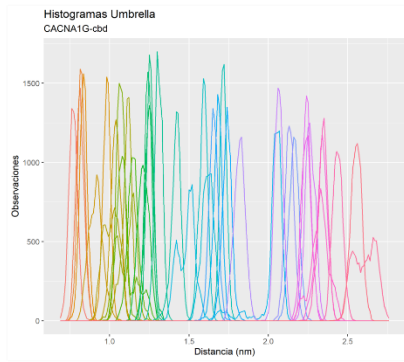
1A)



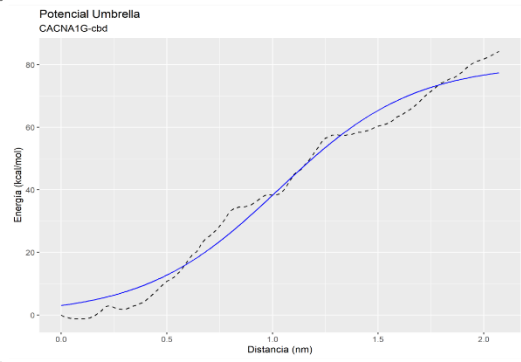
2A)



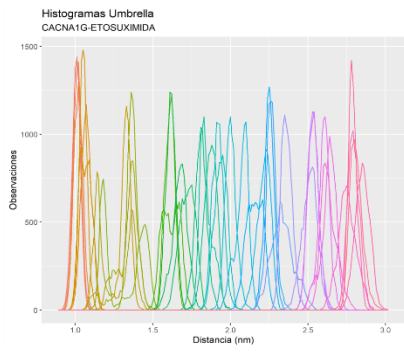
1B)



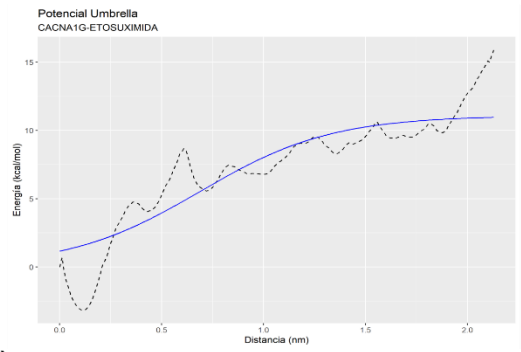
2B)



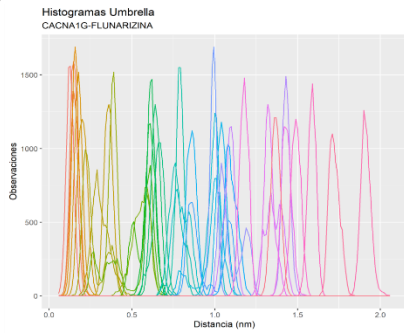
1C)



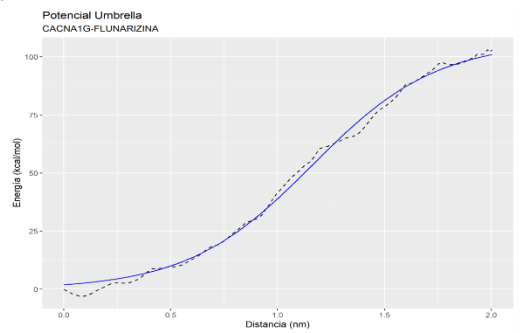
2C)



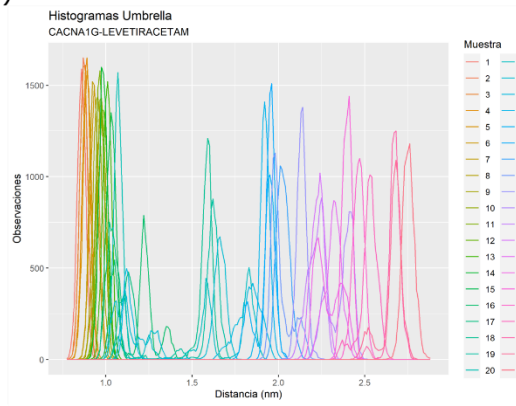
1D)



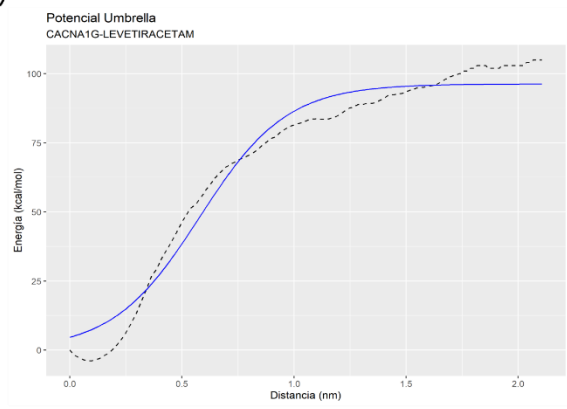
2D)



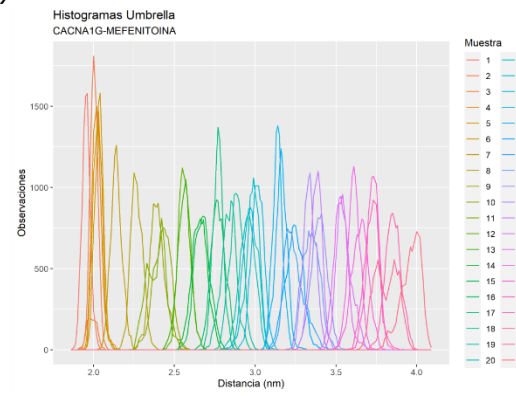
1E)



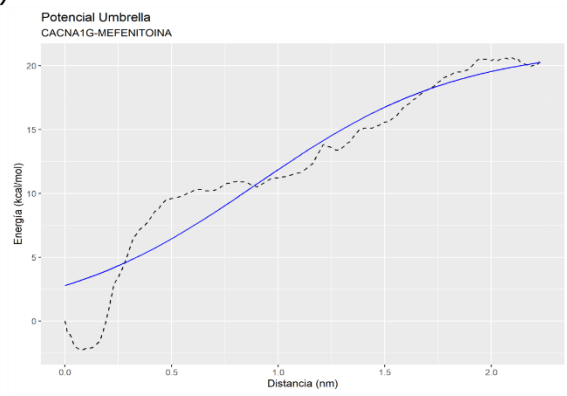
2E)



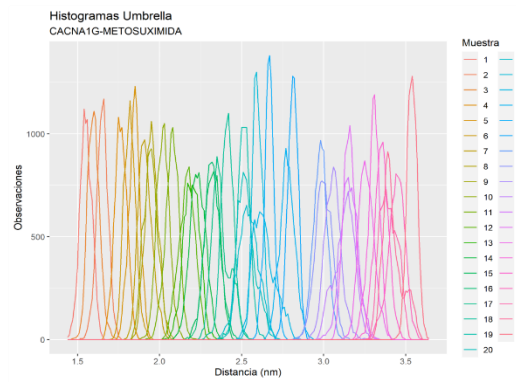
1F)



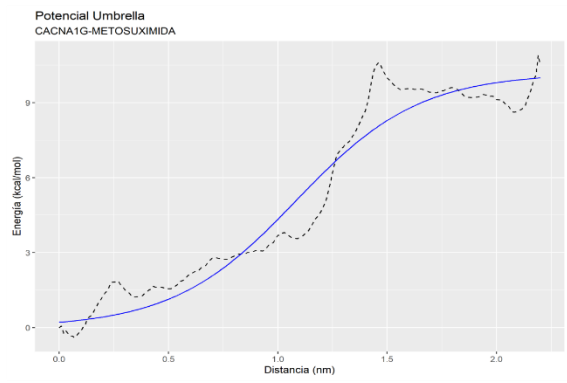
2F)



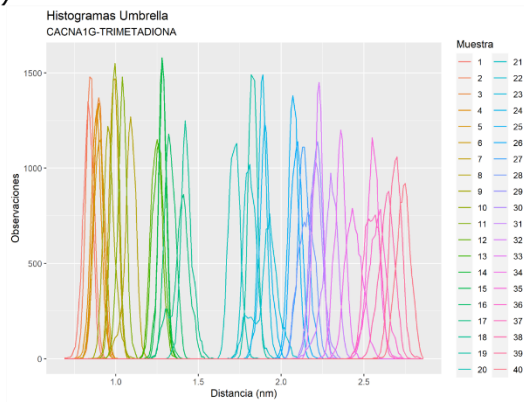
1G)



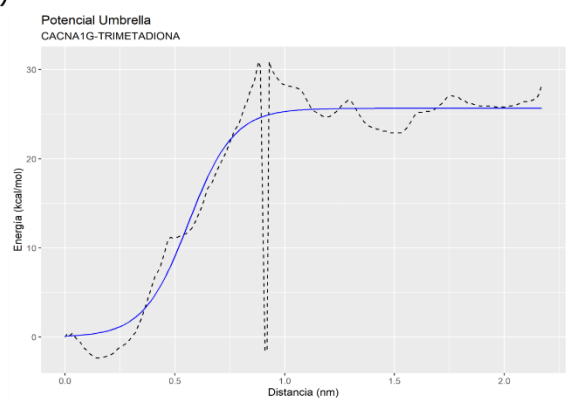
2G)



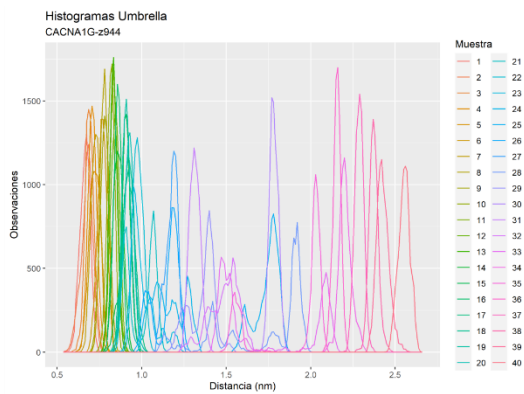
1H)



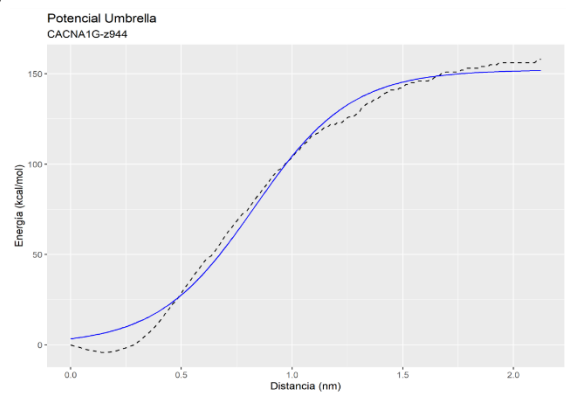
2H)



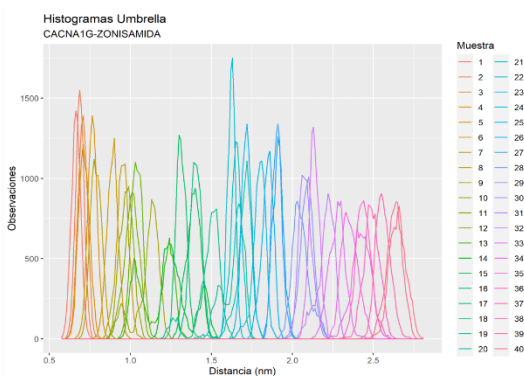
1I)



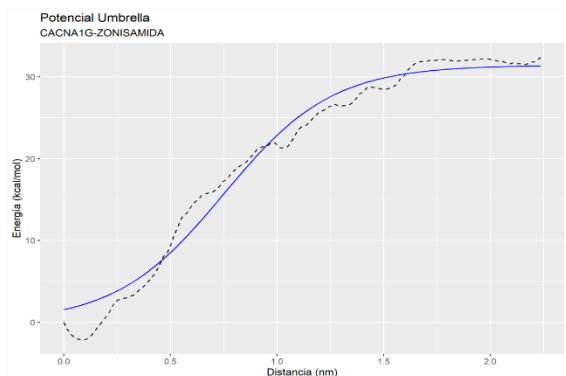
2I)



1J)



2J)



Gráficos de los *umbrella sampling* CACNA1G-ligandos. 1A) Histograma Brivaracetam. 2A) Potencial *umbrella* Brivaracetam. 1B) Histograma Cannabidiol. 2B) Potencial *umbrella* Cannabidiol. 1C) Histograma etosuximida. 2C) Potencial *umbrella* etosuximida. 1D) Histograma flunarizina. 2D) Potencial *umbrella* flunarizina. 1E) Histograma levetiracetam. 2E) Potencial *umbrella* levetiracetam. 1F) Histograma mefenitoina. 2F) Potencial *umbrella* mefenitoina. 1G) Histograma metosuximida. 2G) Potencial *umbrella* metosuximida. 1H) Histograma trimetadiona. 1H) Potencial *umbrella* trimetadiona. 1I) Histograma z944. 1I) Potencial *umbrella* z944. 1J) Histograma Zonisamida. 1J) Potencial *umbrella* Zonisamida.