



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS
FACULTAD DE QUÍMICA

**“RELACIÓN ENTRE ESTUDIOS ELECTROQUÍMICOS Y
ELECTROFISIOLÓGICOS DE ALGUNOS DERIVADOS DE
1,4-NAFTOQUINONA CON POTENCIAL ACTIVIDAD SOBRE CANALES
IÓNICOS DE POTASIO EN OVOCITOS DE *XENOPUS LAEVIS*”**

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

M. en C. THALINA ALEJANDRA RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ

TUTOR: DR. JOSÉ DE JESÚS GARCÍA VALDÉS
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

COMITÉ TUTOR:
DRA. LAURA ESCOBAR PÉREZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. BERNARDO ANTONIO FRONTANA URIBE
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

México, D. F. Noviembre 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado:

Presidente	Dr. Ignacio González Martínez	UAM-Iztapalapa
Vocal	Dr. José Federico del Río Portilla	Instituto de Química, UNAM
Vocal	Dr. Bernardo Antonio Frontana Uribe	Instituto de Química, UNAM
Vocal	Dra. Norma Angélica Macías Ruvalcaba	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Dr. Víctor Manuel Ugalde Saldívar	Facultad de Química, UNAM

La presente tesis se desarrolló en el Laboratorio de Electroquímica y Bioelectroquímica Analítica, 113 del Edificio “F” de la Facultad de Química, UNAM; bajo la dirección del Dr. José de Jesús García Valdés.

Los resultados de este trabajo se presentaron en:

XXIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Electroquímica y 1ª Reunión de “Mexican Section of the Electrochemical Society” Ensenada, Baja California 2008.

XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Electroquímica y 2ª Meeting of the Mexican Section of the Electrochemical Society. Puerto Vallarta, Jalisco 2009.

45º Congreso Mexicano de Química. Riviera Maya, Q. Roo 2010.

Se publicaron en:

T. Rodríguez-Fernández, J. García-Valdés, V. Ugalde-Saldívar, I. González. Electrochemical Study of Phenolic and Quinoid Derivatives with Putative Activity on Ion Channels. ECS Transactions, 15 (2008) 335-343.

T. Rodríguez-Fernández, V. Ugalde-Saldívar, I. González, L.I. Escobar, J. García-Valdés. Electrochemical Strategy to Scout 1,4-naphthoquinones Effect on Voltage Gated Potassium Channels. Bioelectrochemistry 86 (2012) 1–8.

AGRADECIMIENTOS

A la *Universidad Nacional Autónoma de México* y a la *Facultad de Química* por todas las oportunidades para ser mejor. Se siente el GOYA en cada poro de mi piel.

Al *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología* (CONACyT) por la beca No 105374 otorgada durante los estudios de Doctorado.

A la *Dirección General de Asuntos del Personal Académico* (DGAPA) por el financiamiento del proyecto “Propiedades Redox de Canales Iónicos de Potasio” IN215508.

Al *Dr. José de Jesús García Valdés* por su apoyo, paciencia y entendimiento en todo momento. Gracias por todo el conocimiento otorgado, por tu amistad y sobre todo GRACIAS por haber creído en mí siempre.

A los *Miembros del Comité Tutoral*, Dr. Bernardo Frontana Uribe y Dra. Laura Escobar, por guiarme en el trayecto de este trabajo.

A los *Miembros del H. Jurado* por las observaciones y comentarios que aportaron para indudablemente enriquecer este trabajo.

Al *Dr. Víctor Manuel Ugalde Saldívar* por mi formación académica desde siempre, por el apoyo y guía en este trabajo. Gracias por estar siempre al pendiente.

Al *Dr. Ignacio González Martínez* porque su visión hizo posible la orientación de este proyecto. Gracias por su apoyo en todo momento.

Al *Dr. José Correa Basurto* por el tiempo y las enseñanzas en el arte del modelado computacional. Al IPN-Escuela Superior de Medicina por el uso de sus instalaciones.

Al *Professor Olaf Pongs* (University-Hospital Eppendorf) y *Dra. Ligia del Toro* (David Geffen School of Medicine at UCLA) por la donación de clonas de los canales de potasio utilizados en este proyecto.

Al *Posgrado de Ciencias Químicas* por la atención brindada todos estos años.

A la *comunidad científica y académica de esta H. Facultad de Química* que aportó algo en esta investigación. Gracias por mi formación.

RESUMEN:

La actividad de los canales iónicos puede modificarse por la presencia de diversos compuestos. Debido a esto, el objetivo de este trabajo es el estudio de oxidantes como la naftoquinona (NQ) como posible modulador de la actividad de canales iónicos de potasio. Se realizaron ensayos con ovocitos de *Xenopus laevis* en los cuales se expresaron previamente los canales de potasio dependientes de voltaje rKv1.3 y dShIR. Los resultados evidenciaron que la NQ inhibe las corrientes de rKv1.3 pero tiene efecto poco significativo sobre las corrientes de dShIR. Ensayos con otros compuestos oxidantes revelaron que el efecto estructural de la NQ es importante.

Los experimentos demostraron que la inhibición de rKv1.3 es dependiente del potencial redox de NQ. A través de un análisis detallado de las secuencias primarias de los canales en estudio se establecieron tres probables mecanismos de interacción de la NQ con los canales. Las hipótesis propuestas incluyen interacciones hidrofóbicas tipo apilamiento π con aromáticos, formación de puentes de hidrógeno y la interacción con una metionina. Los planteamientos fueron sustentados con estudios de modelado molecular que sugieren que la NQ interacciona con la metionina mediante un mecanismo tipo redox dependiente de su potencial de reducción.

Una importante contribución de este trabajo es la estrategia experimental empleada ya que puede ser utilizada de manera simple para la selección de compuestos a ser evaluados mediante técnicas electrofisiológicas.

ABSTRACT:

The ion channels activity can be modified with several compounds. The goal of this study was to evaluate compounds with oxidizing properties as naphthoquinones (NQ) as potential modulators of potassium ion channels. Other naphthoquinones with different electronic properties induced for different substituents were tested. Assays with potassium channels voltage gated previously expressed in *Xenopus laevis* oocytes demonstrated that NQ inhibited the rKv1.3 currents but not the same effects on dShIR currents. Other oxidizing compounds were tested in attempt to demonstrate the importance of the structural NQ effects.

The experiments showed the redox potential dependence when interacting with proteins. Through a detailed analysis of the primary sequences of the channels established three possible hypotheses about the mechanism of NQ interaction with ionic channels. The hypothesis proposed included: hydrophobic π interactions with aromatic aminoacid residues, hydrogen bonds formation and the interaction with a methionine that exist in both channels. These proposals were sustained with molecular modeling studies that suggested a methionine NQ interaction by a redox reduction potential mechanism dependent.

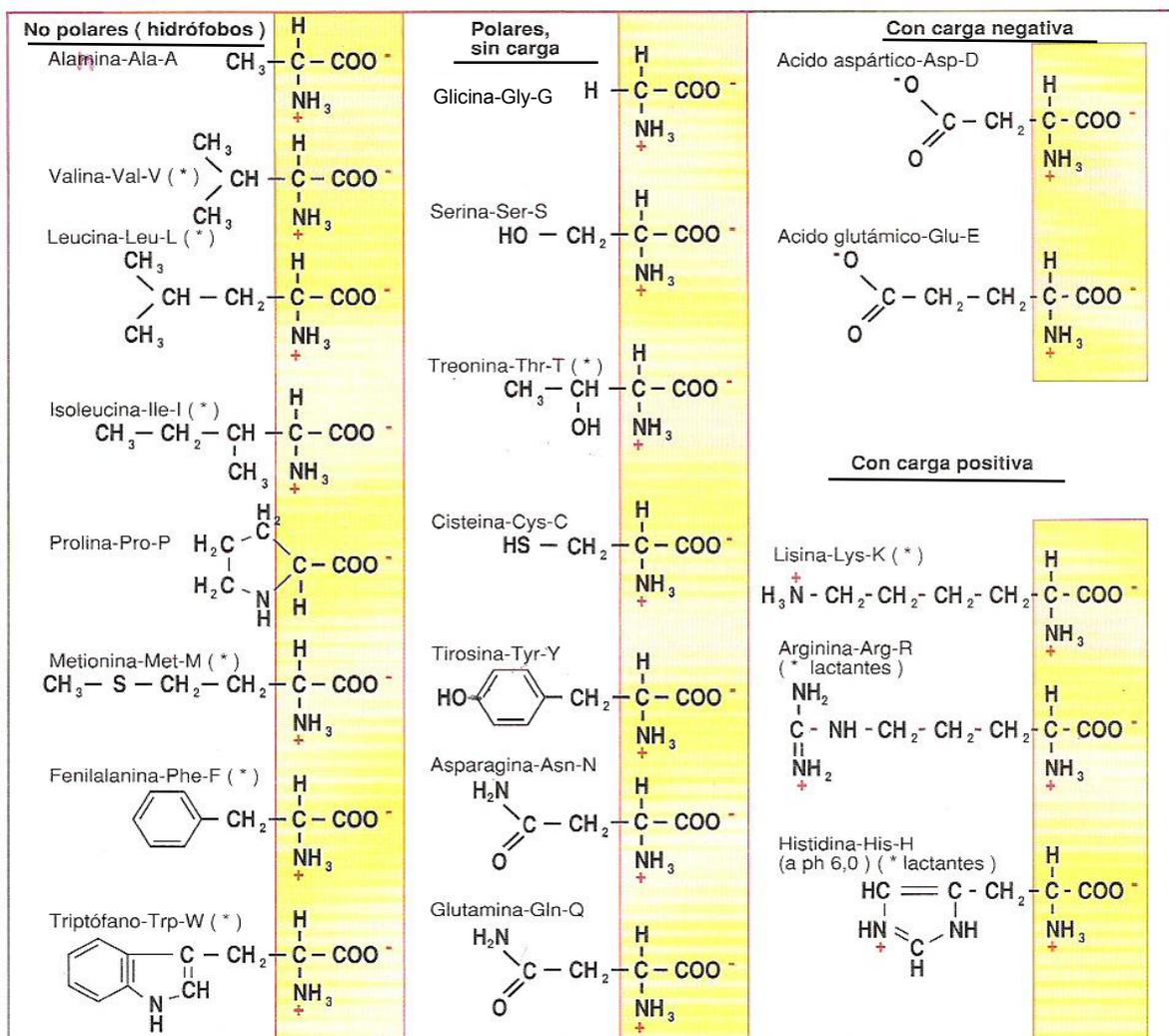
The electrochemical strategy employed is an important contribution to pre-select (in a fine and simple way) the best redox compounds for electrophysiological assays.

η	Coefficiente de Hill
ϵ_i	Energía intramolecular
$[\text{ion}^+]_e$	Concentración de un ión extracelular
$[\text{ion}^+]_i$	Concentración de un ión intracelular
2MeONQ	2-metoxi-3-metil-1,4-naftoquinona
2NH ₂ NQ	2-amino-1,4-naftoquinona
2SEtOH	2-mercaptoetanol
2SO ₃ KNQ	Sal de potasio del 2-ácido sulfónico de 1,4-naftoquinona
5OHNQ	5-hidroxi-1,4-naftoquinona
6S-1P	Canal formado por 6 segmentos transmembranales y un poro
A	Asa intra y extracelulares
aa	Aminoácidos
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
A _e	Área del electrodo
A _{ij} , B _{ij}	Constantes de unión para evaluar la energía libre empírica
ARNm	Ácido Ribonucleico “mensajero”
BA ⁻	Base conjugada del amortiguador
BK	Maxicanal, canal de K ⁺ voltaje dependiente regulado por Ca ²⁺ de máxima conducción
BSA	Albúmina sérica bovina (siglas en inglés)
Bu ₄ NCl	Cloruro de tetrabutilamonio
Bu ₄ NPF ₆	Hexafluorofosfato de tetrabutilamonio
C	Concentración
C _e	Concentración extracelular de iones
C _{ETOH}	Concentración de etanol
C _i	Concentración intracelular de iones
C _{ij} , D _{ij}	Constantes de profundidad máxima de enlace H con O, N y S
C _m	Capacitancia de la membrana
CT	Complejo de transferencia de carga
Cte	Constante
D°	Coefficiente de difusión
DEa	Dominio de electroactividad
DFT	Teoría del Funcional de la Densidad (en inglés)
Ditionita	Ditionita de Sodio, Na ₂ S ₂ O ₄
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
dSh	Canal de K ⁺ Shaker de <i>Drosophila melanogaster</i> (<i>d=D. melanogaster</i>)
dShIR	Canal de K ⁺ Shaker sin dominio de Inactivación (Inactivation Removed en inglés) con delección Δ6-46 aa
DTNB	5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico
E	Potencial
E _{-λ}	Potencial de inversión catódico
E(τ)	Direccionalidad del ángulo τ en un puente de hidrógeno
E _{1/2}	Potencial de Media onda

E_{aux}	Electrodo auxiliar
ECCE	Mecanismo electroquímico-químico-químico-electroquímico
E_e	Potencial externo de la membrana
EF	Ensayos electrofisiológicos
E_H	Potencial de mantenimiento de la célula (en inglés Holding potential)
EHEH	Mecanismo electroquímico-protón-electroquímico-protón
E_i	Potencial interno de la membrana
E_m	Potencial de membrana
E_p	Potencial de pico
E_{pa}	Potencial de pico anódico
E_{pc}	Potencial de pico catódico
E_{pc}^I	Potencial de pico catódico de la señal I
EQ	Ensayos electroquímicos
E_r	Potencial de reposo de membrana
E_{red}	Potencial de reducción
E_{ref}	Electrodo de referencia
E_T	Electrodo de trabajo
E_t	Electrodo de referencia conectado a tierra
EtOH	Etanol
F	Constante de Faraday
Fc	Ferroceno
Fc^+	Ferrocinio
GAPDH	Óxido nítrico sintetasa deshidrogenasa gliceraldehído-3-fosfato
GSH	Glutación Reducido
GSSG	Glutación Oxidado
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
hKv1.3	Canal de Potasio Voltaje-Dependiente de familia 1.3 de humano
i	Corriente experimental
I_a	Corriente anódica de señal I
I_c	Corriente catódica de señal I
IC_{50}	Concentración inhibitoria al 50% de la actividad máxima
I_{CC}	Corriente capacitiva de la membrana
I_{C_m}	Corriente debido a la capacitancia de la membrana
$I_{control}$	Corrientes utilizadas como control obtenidas con pulso a +60 mV
$I_{entrante}$	Corrientes entrantes generadas por la entrada de iones
I_i	Corriente iónica
I_K	Corrientes salientes de potasio
$I_K(dShIr)$	Corrientes salientes de potasio del canal ShIR
$I_K(rKv1.3)$	Corrientes salientes de potasio del canal Kv1.3
I_m	Corriente de la membrana
I_{NQs}	Corrientes salientes de potasio medidas a +60 mV después de la adición de NQs
i_p	Corriente de pico
i_{pa}	Corriente de pico anódico
i_{pa}^I	Corriente de pico catódico de la señal I
i_{pc}	Corriente de pico catódico
I_{redox}	Corrientes inhibitorias de especies oxidantes y reductoras

I_{saliente}	Corrientes salientes generadas por la salida de iones
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
K	Canales de potasio
$K_{1/2}$	Concentración donde ocurre la mitad de la máxima inhibición
Kv	Canal de Potasio Voltaje-Dependiente
Kv1.x	Familia 1 de Canales de Potasio Voltaje-Dependiente
L	Ligante
L-P	Complejo ligante-proteína
MQ	2-metoxi-3,5,6-tricloro-1,4-benzoquinona
MTP	Poros de permeabilidad mitocondrial
n	Número de electrones intercambiados
NCBI	National Center of Biotechnology Information (siglas en inglés)
ND 96	Disolución fisiológica principalmente de sodio concentración 96 mM
NQ	1,4-naftoquinona
NQs	Derivados de 1,4-naftoquinona
nu	Conformación de no unión
nu	Estado de no unión
OCP	Potencial de Circuito Abierto (Open Circuit Potential en inglés)
P	Poros
P	Proteína
Q	Quinona
$Q^{\cdot-}$	Semiquinona o quinona radical anión
Q^{2-}	Quinona dianión
QH_2	Hidroquinona
q_{ij}	Carga atómica
$Qs^{\cdot-}$	Radicales semiquinona
R	Constante de los gases
r_{ij}	Radio atómico
rKv1.3	Canal de Potasio Voltaje-Dependiente de familia 1.3 de rata
RNAc	Ácido Ribonucleico “complementario”
Ru	Resistencia experimental no compensada
R_{Ω}	Resistencia
S	Segmentos Transmembranales
s	Parámetro de solvatación
S4	Sensor de Voltaje
Sh	Canal Shaker
S_j	Parámetros de solvatación
T	Temperatura
t	Tiempo
TEVC	Técnica de fijación de Voltaje con Dos Electrodo, por sus siglas en inglés Two Electrode Voltage Clamp
u	Conformación de unión
V	Voltaje
v	Velocidad de barrido de potencial
v	Volumen que rodea a un átomo
VC	Voltamperometría Cíclica
V_m	Voltaje de la membrana

VMD	Visual Molecular Dinamics software
V_{nu}	Evaluación del estado de no unión para estimar el campo de fuerza
V_u	Evaluación del estado de unión para estimar el campo de fuerza
W_{elec}	Fuerzas electrostáticas
W_H	Fuerza de formación de puentes de hidrógeno
W_{sol}	Fuerzas de desolvatación
W_{vdw}	Fuerzas de repulsión/dispersión de Van der Waals
z	Carga de un ión
ΔE_p	Diferencia de potencial ($E_{pa}-E_{pc}$)
ΔE_p^v	Diferencia de potencial a una velocidad dada
ΔG	Energía libre empírica de unión
ΔS_{conf}	Pérdida de entropía después de la formación del complejo L-P



Clasificación de acuerdo a su cadena lateral y estructura química. Nombre y nomenclatura abreviada de tres y una letra de los aminoácidos que conforman la proteínas.

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	1
1.1. ELECTROFISIOLOGÍA	1
1.1.1. <i>Canales Iónicos.</i>	1
1.1.2. <i>Canales de Potasio K⁺.</i>	5
1.1.3. <i>Canales de Potasio K⁺ voltaje-dependientes (Kv).</i>	7
1.1.4. <i>Flujo iónico en la membrana y la ecuación de Nernst.</i>	9
1.1.5. <i>Técnica de Fijación de Voltaje con dos electrodos (TEVC).</i>	12
1.1.6. <i>Ovocitos de Xenopus laevis como modelo biológico.</i>	15
1.2. QUINONAS	16
1.3. MODELADO Y ACOPLAMIENTO MOLECULAR	21
 CAPÍTULO 2.	 25
HIPÓTESIS	25
2.1. OBJETIVOS	25
2.1.1. <i>Objetivo General:</i>	25
2.1.2. <i>Objetivos Particulares:</i>	25
2.2. <i>ALCANCE:</i>	26
 CAPÍTULO 3. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	 27
3.1. ESTUDIOS ELECTROQUÍMICOS (EQ)	27
3.1.1. <i>Reactivos y disoluciones.</i>	27
3.1.2. <i>Mediciones Electroquímicas.</i>	28
3.2. ESTUDIOS ELECTROFISIOLÓGICOS (EF)	29
3.2.1. <i>Reactivos.</i>	29
3.2.2. <i>Expresión de los canales de potasio en ovocitos.</i>	29
3.2.3. <i>Registros Electrofisiológicos</i>	30
3.3 ESTUDIOS DE MODELADO MOLECULAR Y DE ACOMPLAMIENTO	32
3.3.1. <i>Construcción de los modelos 3D de las proteínas (receptores).</i>	32
3.3.2. <i>Refinamiento de ligantes.</i>	33
3.3.3. <i>Reconocimiento ligante–receptor.</i>	33
3.3.4. <i>Comparación in vivo vs in silico.</i>	33
 CAPÍTULO 4. ESTUDIOS ELECTROQUÍMICOS (EQ)	 35
4.1 DISCUSIÓN DE RESULTADOS ELECTROQUÍMICOS	37
4.1.1. <i>Caracterización de NQ en medio aprótico (DMSO).</i>	37
4.1.2. <i>Caracterización de NQs en medio aprótico.</i>	40
4.1.3. <i>Caracterización de NQ en medio prótico (ND 96).</i>	50
4.1.4. <i>Caracterización de NQs en medio prótico.</i>	55
 CAPÍTULO 5. ESTUDIOS ELECTROFISIOLÓGICOS (EF)	 61
5.1. DISCUSIÓN DE RESULTADOS ELECTROFISIOLÓGICOS	62
5.1.1. <i>Efecto de NQ sobre las IK de rKv1.3 y dShIR.</i>	62
5.1.2. <i>Efecto de la concentración de NQ sobre las IK de rKv1.3.</i>	67

5.1.3. Efecto del potencial impuesto NQ sobre las IK de rKv1.3 y dShIR.	69
5.1.4. Efecto de compuestos redox sobre las IK de rKv1.3.	70
5.1.5. Comparación de ensayos EF y EQ con NQs.	73
5.1.6. Análisis de secuencias primarias de rKv1.3 vs dShIR.	75
5.1.6.1. <u>Interacciones hidrofóbicas.</u>	76
5.1.6.2. <u>Interacción con Metionina.</u>	76
5.1.6.3. <u>Interacciones vía Puentes de hidrógeno.</u>	78
CAPÍTULO 6. ESTUDIOS DE MODELADO MOLECULAR	81
6.1.DISCUSIÓN DE RESULTADOS DE ESTUDIOS POR DOCKING:	82
6.1.1. Modelado por Homología.	82
6.1.2. Predicción de sitios de interacción.	85
6.1.3. Interacciones in silico vs actividad in vivo.	89
CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN	101
7.1. Ensayos Electroquímicos	102
7.2. Ensayos Electrofisiológicos	103
7.3. Estudios de Modelado Molecular	104
CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES	107
PERSPECTIVAS	109
ANEXO 1. ELECTROQUÍMICA	111
A1.1. Sistema de referencia Ferrocinio /Ferroceno (Fc ⁺ /Fc).	111
A1.1.1 Sistema Ferrocinio /Ferroceno (Fc ⁺ / Fc) en DMSO.	112
A1.1.2. Sistema Ferrocinio /Ferroceno (Fc ⁺ / Fc) en ND 96.	112
A1.2. Estudios de simulación con DigiElch7.	116
ANEXO 2. ELECTROFISIOLOGÍA	125
A2.1. Transcripción <i>in vitro</i> del RNA de dShIR.	125
A2.2. Análisis estadístico: comparación de medias y varianzas.	127
A2.2.1. NQ vs 5OHNQ (rKv1.3).	128
A2.2.2. NQ vs 2NH2HNQ (rKv1.3).	128
A2.2.3. NQ vs 5OHNQ (dShIR).	129
A2.2.4. NQ vs 2NH2HNQ (dShIR).	129
ANEXO 3. ESTUDIOS DE MODELADO Y ACOPLAMIENTO MOLECULAR	131
A3.1. Modelado por Homología de monómeros.	131
A3.2. Estudios de acoplamiento en tetrámeros.	143
A3.3. Predicción de sitios de interacción de NQ en Kv1.3.	145
A3.4. Predicción de sitios de interacción de NQs en Kv1.3.	150
PUBLICACIONES	155
BIBLIOGRAFIA	173

INDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1.1. Esquema de una membrana celular donde se muestran los canales iónicos en estado abierto, cerrado y la emulación del transporte iónico que se lleva a cabo a través de ellos.	1
Figura 1.2. Esquema de estímulos que pueden activar al mecanismo de compuerta de los canales iónicos. 1) Canales voltaje dependientes, 2, 3) Canales ligando dependientes extra e intracelulares y 4) Canales mecanosensibles.	2
Figura 1.3. Esquema del mecanismo de compuerta de los canales Voltaje-dependientes activado por el desplazamiento del Sensor de Voltaje (S4).	3
Figura 1.4. Esquema del filtro de selectividad de los canales de K ⁺ y la interacción de los iones K ⁺ en comparación con Na ⁺ .	5
Figura 1.5. Clasificación de los canales de K ⁺ de acuerdo a su topología. A) Representación esquemática de subunidad α . B) Arreglo transmembranal de un homotetrámero simétrico funcional.	6
Figura 1.6. Esquema que representa el flujo de iones involucrados en el establecimiento del potencial de membrana.	11
Figura 1.7. Circuito eléctrico simple análogo de la membrana celular.	12
Figura 1.8. (A) Pulso de potencial cuadrado. (B) Corrientes típicas registradas de una célula excitable en condiciones de fijación de voltaje.	13
Figura 1.9. Diagrama del circuito empleado en la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos.	14
Figura 1.10. Ranas hembras <i>Xenopus laevis</i> (izquierda) y ovocitos en etapas V-VI (derecha).	16
Figura 1.11. Estructuras de algunas quinonas.	18
Figura 1.12. Etapas (antes y después) de evaluación del campo de fuerza de unión del acoplamiento L-P. Proteína (P) y ligante (L) en conformación de no unión (nu). Antes: evalúa la energía intramolecular (ϵ_i) de la transición estimada para adquirir la conformación necesaria antes del L-P (u). Después: evalúa la ϵ_i de la transición a u para el L-P.	21

CAPÍTULO 3

Figura 3.1. Sistema de TEVC para el monitoreo de las corrientes macroscópicas de potasio de los canales en estudio. El sistema está compuesto por dos electrodos de KCl (1 M)/AgCl/Ag ^o (capilares) y tres NaCl (96 mM)/AgCl/Ag ^o (externos). Volumen de celda 800 μ L.	31
---	----

CAPÍTULO 4

Figura 4.1. Voltamperograma típico de 6.3 mM de NQ en 0.1 M Bu ₄ NPF ₆ /DMSO en dirección catódica (⊖), anódica (•) y E _λ = -1.5 V (--) comenzando desde OCP. Velocidad de barrido de potencial de 0.1 V/s, E _T carbón vítreo (ϕ 7.1 mm ²), E _{aux} Pt ^o y E _{ref} electrodo de Bu ₄ NCl (3M)/AgCl/Ag ^o en DMSO.	38
Figura 4.2. Análisis de: A) $ i_p $ en función de $v^{1/2}$, B) $ \Delta E_p $, C) $ i_{pa}/i_{pc} $ y D) $ i_p/v^{1/2} $ en función de Log v .	39

- Figura 4.3. Comparación de voltamperogramas de NQs en 0.1 M Bu₄NPF₆ /DMSO en dirección catódica (negro) y anódica (gris) a una velocidad de barrido de potencial de 0.1 V/s desde OCP. E_T carbón vítreo (φ 7.1 mm²), E_{aux} Pt^o y E_{ref} electrodo de Bu₄NCl (3M)/AgCl/Ag^o en DMSO. 41
- Figura 4.4. Voltamperogramas de A) 5 mM de 2MeONQ, B) 5.8 mM de 2NH₂NQ, C) 5.7 mM de 5OHNQ y D) 3.6 mM de 2SO₃KNQ en 0.1 M Bu₄NPF₆/DMSO como electrolito soporte, en dirección catódica (○) y anódica (*). Estudios de potenciales de inversión catódico E_λ (---). Trazos obtenidos a 0.1 V/s comenzando desde OCP, E_T carbón vítreo (φ 7.1 mm²), E_{aux} Pt^o y E_{ref} electrodo de Bu₄NCl (3M)/AgCl/Ag^o en DMSO. 41
- Figura 4.4 (continuación). Voltamperogramas de A) 5 mM de 2MeONQ, B) 5.8 mM de 2NH₂NQ, C) 5.7 mM de 5OHNQ y D) 3.6 mM de 2SO₃KNQ en 0.1 M Bu₄NPF₆/DMSO como electrolito soporte, en dirección catódica (○) y anódica (*). Estudios de potenciales de inversión catódico E_λ (---). Trazos obtenidos a 0.1 V/s comenzando desde OCP, E_T carbón vítreo (φ 7.1 mm²), E_{aux} Pt^o y E_{ref} electrodo de Bu₄NCl (3M)/AgCl/Ag^o en DMSO. 42
- Figura 4.5. Análisis de: 1) |i_p| en función de v^{1/2}, 2) |i_p/v^{1/2}| en función de Log v, 3) inserto |i_{pa}/i_{pc}| en función de Log v de: A) 2MeONQ, B) 2NH₂NQ, C) 5OHNQ y D) 2SO₃KNQ. Datos obtenidos a partir voltamperogramas adquiridos a diferente v. 42
- Figura 4.5. (continuación) Análisis de: 1) |i_p| en función de v^{1/2}, 2) |i_p/v^{1/2}| en función de Log v, 3) inserto |i_{pa}/i_{pc}| en función de Log v de: A) 2MeONQ, B) 2NH₂NQ, C) 5OHNQ y D) 2SO₃KNQ. Datos obtenidos a partir voltamperogramas adquiridos a diferente v. 43
- Figura 4.6. Voltamperograma de 100 μM de NQ en medio ND 96 en dirección catódica (–) y anódica (*) comenzando desde OCP a una velocidad de barrido de potencial de 0.1 V/s, E_T carbón vítreo (φ 7.1 mm²), E_{aux} Pt^o y E_{ref} electrodo acuoso de Cl⁻(0.1M)/AgCl/Ag^o. 51
- Figura 4.7. Voltamperogramas de 100 μM de NQ en medio ND 96 en dirección catódica comenzando desde OCP a diferentes velocidades de barrido de potencial. E_T carbón vítreo (φ 7.1 mm²), E_{aux} Pt^o y E_{ref} electrodo acuoso de Cl⁻(0.1M)/AgCl/Ag^o. Sólo se muestran los voltamperogramas a 0.02, 0.1, 0.5 y 1 V/s. 53
- Figura 4.8. Análisis de A) |i_p| en función de v^{1/2} B) |ΔE_p| C) |i_{pa}/i_{pc}| y D) |i_p/v^{1/2}| en función de Log v. 54
- Figura 4.9. Voltamperogramas de 100 μM de A) 2NH₂NQ y B) 5OHNQ en ND 96 como electrolito soporte en dirección catódica (*) y anódica (–) desde OCP a una velocidad de barrido de potencial de 0.1 V/s, E_T carbón vítreo (φ 7.1 mm²), E_{aux} Pt^o y E_{ref} electrodo acuoso de Cl⁻(0.1M)/AgCl/Ag^o. 56
- Figura 4.10. Voltamperogramas de 100 μM de 2NH₂NQ (azul), NQ (negro) y 5OHNQ (rojo) en ND 96 como electrolito soporte en dirección catódica desde OCP a velocidades de barrido de potencial de 0.05 (–), 0.2 (··), 0.5 (–) y 1 V/s (◇, ○, Δ respectivamente), E_T carbón vítreo (φ 7.1 mm²), E_{aux} Pt^o y E_{ref} electrodo acuoso de Cl⁻ (0.1M)/AgCl/Ag^o. 57
- Figura 4.11. Análisis de: A) |ΔE_p| en función de Log v, B) |i_p| en función de v y C) |i_p/v^{1/2}| en función de Log v, inserto |i_{pa}/i_{pc}| en función de Log v de: 1) 2NH₂NQ, 2) 5OHNQ. 59

CAPÍTULO 5

- Figura 5.1. Corrientes salientes de potasio en función del tiempo para los canales rKv1.3 (A) y dShIR (B), I_K(rKv1.3) y I_K(dShIR) respectivamente, expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*. El potencial de mantenimiento empleado fue de –60 mV y el protocolo de pulsos fue –60 a +60 mV con incrementos de +20 mV durante 130 ó 180 ms. Trazos a +60(i), +40(ii), +20(iii), 0(iv), –20(v), –40 y –60(vi) mV. En el inserto se muestran las corrientes endógenas de los ovocitos nativos (control negativo). 63

Figura 5.2. Gráficos $I=f(t)$ obtenidos con ovocitos nativos (controles negativos) evaluando el efecto del EtOH. El protocolo de pulsos utilizado fue -60 a +60 mV con intervalos de +20 mV partiendo desde un potencial de mantenimiento de la célula de -60 mV.	64
Figura 5.3. Gráfico de $I_{\text{control}}/I_{\text{EtOH}} = f(C_{\text{EtOH}})$ de controles positivos (rKv1.3).	65
Figura 5.4. Gráfico de $I_{\text{control}}/I_{\text{NQ}} = f(C_{\text{NQ}})$ de ovocitos nativos en ausencia y presencia de NQ.	65
Figura 5.5. Inhibición de las corrientes de $I_{\text{K}}(\text{Kv1.3})$ (A) e $I_{\text{K}}(\text{ShIR})$ (B) después de la adición de 100 μM de NQ. Los trazos se denotaron como (i) control positivo; (ii) adición de 200 mM EtOH y (iii) adición de 100 μM de NQ y después de diversos lavados (lavado). El potencial de mantenimiento empleado fue de -60 mV y el protocolo de pulsos fue -60 a +60 mV durante 200 ms.	66
Figura 5.6. Evaluación del porcentaje (%) de inhibición de las corrientes de rKv1.3 en función de la concentración de NQ.	68
Figura 5.7. Evaluación del porcentaje (%) de inhibición de $I_{\text{K}}(\text{Kv1.3})$ después de la adición de 100 μM de NQ en función del potencial de pulso aplicado. El potencial de mantenimiento utilizado para la obtención de las corrientes fue de -60 mV y el protocolo de pulsos fue -60 a 0, +20, +40 y +60 mV durante 200 ms respectivamente.	69
Figura 5.8. Evaluación del efecto de compuestos redox sobre las corrientes de rKv1.3, I_{redox} . Curso temporal de I_{K} (rKv1.3) después de la adición 100 μM de (A) H_2O_2 , y (B) Ditionita seguidas de la inhibición con NQ y (C) después de la adición de 100 μM de NQ seguida de Ditionita. Los círculos representan las corrientes medidas al final de los pulsos (80 ms) de +60 mV aplicados cada 330 ms. Las adiciones se denotan con flechas hacia abajo (\downarrow), mientras que los lavados con flechas hacia arriba (\uparrow).	71
Figura 5.9. Gráfico de $I=f(t)$ del curso temporal de I_{K} (rKv1.3) después de la adición 100 μM de NQ y ditionita sin lavados previos. Los círculos representan las corrientes medidas al final de los pulsos (80 ms) de +60 mV aplicados cada 330 ms. Las adiciones se denotan con flechas hacia abajo (\downarrow), mientras que los lavados con flechas hacia arriba (\uparrow).	73
Figura 5.10. Porcentaje de inhibición de las corrientes salientes de potasio de los canales rKv1.3 (A) and dShIR (B) después de la adición de 100 μM de NQs (NQ, $2\text{NH}_2\text{NQ}$ y 5OHNQ). Las corrientes se obtuvieron aplicando un pulso de potencial de +60 mV durante 200 ms partiendo de un potencial de mantenimiento de -60 mV. Los datos se presentan como la media \pm SEM (*, # $p < 0.05$ vs NQ, $n=6$). En la parte superior de la figura se muestra la escala de potenciales de reducción obtenidos en medio ND 96 de las NQs.	74
Figura 5.11. Alineamiento de las secuencias de aa de los canales rKv1.3 y dShIR.	77
CAPÍTULO 6	
Figura 6.1. Comparación de monómeros de rKv1.3 (tonos verde) y hKv1.3 (gris) obtenidos con los moldes 2r9rB (izq) y 3lutB (der). Las diferencias en A1 y A3 están magnificadas e indicadas con flechas blancas.	84
Figura 6.2. Monómeros de Kv1.3 (tonos verdes) en comparación con dShIR (tonos rojos) utilizando como molde a 2r9rB (rojo) y 3lutB (rosa). En ambos monómeros se observan diferencias en cuanto a forma y orientación espacial de A1 y A3.	84
Figura 6.3. Homotetrámeros de Kv1.3 y dShIR generados con SymmDock utilizando como molde a 2r9rB. En una vista lateral (extremos) y superior (centro) de las proteínas se observa la orientación espacial que adopta A1 y A3.	85
Figura 6.4. Predicción de cavidades por Q-SiteFinder en monómeros de Kv1.3 y dShIR modelados con 2r9rB y 3lutB. Las cavidades de interacción se muestran en colores que van desde turquesa \rightarrow verde \rightarrow azul \rightarrow morado \rightarrow naranja \rightarrow café dependiendo de su potencial de unión, siendo es el más favorable el turquesa.	87
Figura 6.5. Comparación de los 100 mejores acoplamientos NQ-canal considerando una	88

desviación estándar de 0.5 Å. Los confórmers se representan en forma de líneas sobre el sitio de interacción. Los monómeros de Kv1.3 fueron modelados con 2r9rB (confórmers en agua) y 3lutB (verde), mientras que dShIR fue modelado con 2r9rB (rojo).
 Figura 6.6. Representación de columna 1 (A) y columna 2 (B) de tablas 6.2-6.3. A: Acoplamiento NQ-canal más estable mostrando sobre el sitio de P donde ocurre. B: Representación en forma de líneas de los aa con los que interacciona la NQ para generar el confórmer más estable.

ANEXO 1

Figura A1.1. Voltamperogramas de Fc en ND 96 obtenidos en dirección anódica comenzando desde OPC a diferentes velocidades de barrido de potencial (sólo se muestran a 0.05, 0.1, 0.5 y 1V/s). E_T carbón vítreo (ϕ 7.1 mm2), E_{aux} Pt° y E_{ref} electrodo acuoso de Cl(0.1 M)/AgCl/Ag°.	113
Figura A1.2. Simulación de voltamperogramas de NQ y 5OHNQ en ACN obtenidos a diferente v .	117
Figura A1.3. Simulación de voltamperogramas de 5OHNQ en DMSO obtenidos a diferente v .	118
Figura A1.4. Simulación de voltamperogramas de 5OHNQ en DMSO obtenidos a diferente v aumentando el barrido catódico de regreso hasta -0.8 V.	119
Figura A1.5. Simulación de voltamperogramas de 5OHNQ en DMSO obtenidos a diferente v aumentando el barrido catódico de regreso hasta -0.8V sin tomar en cuenta la ecuación 10.	120
Figura A1.6. Mecanismo de reducción de NQ en ND 96.	121
Figura A1.7. Mecanismo de reducción de 2NH ₂ NQ en ND 96.	123
Figura A1.8. Mecanismo de reducción de 5OHNQ en ND 96.	124

ANEXO 3

Figura A3.1. Análisis comparativo de secuencias de nucleótidos del canal rKv1.3, NM:019270.3 reportada en NCBI y la secuencia proporcionada por Professor Olaf Pongs.	135
Figura A3.2. Análisis comparativo de secuencias NP_728123.1 de dShIR y la proporcionada por Ligia Toro.	136
Figura A3.3. Análisis comparativo de secuencias de rKv1.3 y de hKv1.3 NP_002223.3 reportada por Grissmer.	138
Figura A3.4. Análisis comparativo de secuencias de rKv1.3, hKv1.3, dShIR con el molde 2r9rB.	140
Figura A3.5. Análisis comparativo de secuencias de rKv1.3, hKv1.3, dShIR con el molde 3lutB.	142
Figura A3.6. Acoplamientos de NQ con el tetrámero de rKv1.3_2r9rB encontrados mediante docking. Para el agrupamiento de las interacciones se considera una desviación estándar de 0.5Å. Los confórmers se representan en forma de líneas sobre el sitio de interacción.	143
Figura A3.7. Acoplamiento de NQ en A3 de rKv1.3_2r9rB y representación del confórmer más estable formado con Met308.	144
Figura A3.8. Acoplamiento de NQ en A3 de rKv1.3_3lutB y representación del confórmer más estable formado con Met308.	144

ÍNDICE DE TABLAS
CAPÍTULO 4

Tabla 4.1. Potenciales $E_{1/2}$ de NQs obtenidos en DMSO/ V (vs Fc^+/Fc).	41
Tabla 4.2. Valores de E_{pc} determinados en medio ND 96 / V (vs Fc^+/Fc)	58

CAPÍTULO 6

Tabla 6.1. Tabla de comparación de EF y de acoplamiento (DOCKING) de Kv1.3 y dShIR con NQ.	89
Tabla 6.2. Agrupamiento de conformeros NQ-rKv1.3_2r9rB que interactúan por la parte extracelular de la proteína.	92
Tabla 6.3. Agrupamiento de conformeros NQ-dShIR_2r9rB que interactúan por la parte extracelular de la proteína.	93
Tabla 6.4. aa que constituyen la cavidad en A3 del canal rKv1.3.	94
Tabla 6.5. Agrupamiento de conformeros NQs-Kv1.3 que interactúan por la parte extracelular de la proteína.	97
Tabla 6.6. Agrupamiento de conformeros NQs-dShIR que interactúan por la parte extracelular de la proteína.	98
Tabla 6.7. Tabla de comparación de experimentos EQ, EF y de acoplamiento (Docking) de NQ, 2NH ₂ NQ y 5OHNQ.	99

ANEXO 1

Tabla A1.1. Datos electroquímicos de Fc^+/Fc en DMSO y ND 96.	112
Tabla A1.2. Datos electroquímicos de NQs en DMSO (valores representan r^2).	115
Tabla A1.3. Datos empleados para la simulación de voltamperogramas con DigiElch7.	116
Tabla A1.4. Datos electroquímicos de NQs en ND 96 (valores representan r^2).	122

ANEXO 2

Tabla A2.1. Análisis estadístico de NQ vs 5OHNQ en rKv1.3.	129
Tabla A2.2. Análisis estadístico de NQ vs 2NH ₂ NQ en rKv1.3.	129
Tabla A2.3. Análisis estadístico de NQ vs 5OHNQ en dShIR.	130
Tabla A2.4. Análisis estadístico de NQ vs 2NH ₂ NQ en dShIR.	130

ANEXO 3

Tabla A3.1. Aminoácidos que forman la cavidad en A3 donde se observa la interacción con la Met.	146
Tabla A3.2. Agrupamiento de conformeros NQ-rKv1.3_3lutB que interactúan por la parte extracelular de la proteína.	147
Tabla A3.3. Agrupamiento de conformeros NQ-hKv1.3_2r9rB que interactúan por la parte extracelular de la proteína.	148
Tabla A3.4. Agrupamiento de conformeros NQ-hKv1.3_3lutB que interactúan por la parte extracelular de la proteína.	149

Tabla A3.5. Agrupamiento de conformeros 5OHNQ_Kv1.3 que interaccionan por la parte extracelular de la proteína.	150
Tabla A3.6. Agrupamiento de conformeros 2NH ₂ NQ-Kv1.3 que interaccionan por la parte extracelular de la proteína.	151
Tabla A3.7. Agrupamiento de conformeros 5OHNQ-dShIR que interaccionan por la parte extracelular de la proteína.	152
Tabla A3.8. Agrupamiento de conformeros 2NH ₂ NQ-dShIR que interaccionan por la parte extracelular de la proteína.	153

INTRODUCCIÓN

Los canales iónicos son proteínas que atraviesan la membrana celular formando poros acuosos que se abren y/o cierran en respuesta a estímulos específicos como cambios en el voltaje. Una vez abiertos, permiten el paso selectivo de iones Na^+ , K^+ , Ca^{2+} o Cl^- a través de la membrana a favor de un gradiente electroquímico. Los canales de potasio (K) activados por voltaje (Kv) como el Kv1.3 están principalmente involucrados en procesos cardiacos, de excitabilidad neuronal y contracción muscular. Por otra parte, el canal Shaker (Sh) homólogo del Kv1.1 juega un papel importante en la excitabilidad de las células fotorreceptoras en *Drosophila melanogaster* (dSh) y su actividad puede modificarse en presencia de algunos compuestos. En las membranas celulares los procesos de transducción de señales dan lugar a agentes oxidantes; entonces, la presencia o ausencia de compuestos con propiedades redox podrían ser un mecanismo modulador importante. Se ha demostrado que la actividad de las quinonas (Q) está relacionada con la capacidad de aceptar uno o dos electrones (potencial redox) para formar su correspondiente radical anión ($\text{Q}^{\cdot-}$) o dianión (Q^{2-}). A su vez, el potencial redox se modifica por la presencia de sustituyentes en el anillo y los efectos electrónicos que le confiere su entorno. Entonces para este tipo de sistemas, los efectos antes descritos son de gran importancia ya que afectan directamente sus propiedades redox y en algunos casos se ha informado que modifican su actividad biológica.

Ante este panorama y en vías de aportar información adicional acerca de la posible modulación de la actividad de los canales iónicos Kv1.3 (rata) rKv1.3 y dShIR (dSh con deleción $\Delta 6-46$) en función del potencial redox de naftoquinonas (NQs), se llevaron a cabo estudios electroquímicos (EQ) por Voltamperometría Cíclica (VC). Se analizó la relación existente entre las propiedades electrónicas de NQ en medio acuoso (medio fisiológico ND 96) y no acuoso (dimetilsulfóxido, DMSO). Se evaluó la actividad de los canales en presencia de NQs mediante ensayos electrofisiológicas (EF) de Fijación de Voltaje con Dos Electrodo (TEVC, por sus siglas en inglés). Los resultados se discuten con relación con el potencial redox y las posibles interacciones derivadas de la estructura química de los

compuestos en estudio. Finalmente, mediante el modelado computacional se confirmaron las interacciones NQ-canal propuestas con base en los resultados EQ y EF. Los estudios resultan de gran importancia ya que el potencial redox asociado a las especies involucradas podría ser un indicativo de la energía asociada al proceso de acoplamiento de estas especies con los canales iónicos.

Para evaluar los efectos estructurales de NQ y en un intento de simular los ambientes a los que puede enfrentarse la NQ al interactuar con rKv1.3, previamente se realizaron estudios por VC de cinco derivados en medio hidrofóbico e hidrofílico. En DMSO, se observó un típico mecanismo de reducción mono-electrónica en dos etapas mientras que en ND 96 ocurre de manera bi-electrónica en una sola etapa. Se seleccionaron los dos derivados de NQ que presentaron la mayor diferencia de potencial para realizar estudios por TEVC.

Los estudios por TEVC con ovocitos de *Xenopus leavis* demostraron que la adición de NQ disminuye las corrientes de rKv1.3, mientras que en dShIR su efecto es poco significativo. Después de lavados exhaustivos se sugiere que la interacción NQ-rKv1.3 es poco reversible y más importante que con dShIR. Los ensayos modificando la concentración de NQ y el potencial del pulso evidenciaron que la inhibición de rKv1.3 ocurre de manera dependiente de la concentración e independiente del potencial impuesto.

Se propone que la inhibición de rKv1.3 ocurre vía reacciones redox. Para verificar lo anterior, se evaluó el curso temporal de las corrientes de rKv1.3 en presencia de otros compuestos de naturaleza oxidante y reductora tales como H₂O₂ y ditionito de sodio (ditionita). Se observó una ligera disminución de las corrientes en presencia de H₂O₂, efecto que se elimina después de diversos lavados. Por otra parte, compuestos reductores como la ditionita no produce efecto sobre el canal. Los hallazgos sugieren que las propiedades oxidantes participan en la interacción NQ-canal y que la estructura de NQ es un factor importante. Los ensayos EF con las NQ seleccionadas demostraron que la inhibición de las corrientes de rKv1.3 es dependiente del potencial redox de las mismas. Interesantemente,

aunque ambos canales pertenecen a la misma familia (Kv1.x) presentaron comportamientos diferentes en cuanto a su modulación frente a las NQ's.

Lo anterior, sugiere que la modulación de rKv1.3 pudiera estar ocurriendo de una manera más fina y en sitios muy específicos de la proteína. Con base en los ensayos por VC, TEVC y el análisis detallado de la estructura primaria de ambos canales, se propone que las características estructurales de las NQ's (aromaticidad y sustituyentes que favorecen la formación de puentes de hidrógeno) son importantes para la interacción con rKv1.3. La inhibición de las corrientes de rKv1.3 se explica por la interacción de NQ con residuos de aminoácidos (aa) de la estructura primaria del canal, que quizás contribuyan favoreciendo su proceso de reducción en los alrededores de la proteína. Intentando sustentar las hipótesis planteadas se realizaron estudios de acoplamiento (docking). Los resultados revelan que la interacción NQ-canal es favorecida por la parte extracelular, a pesar de la naturaleza hidrofóbica de NQ. Se encontró evidencia de que la estructura del Kv1.3 es importante para la interacción con NQ y que ésta, se favorece por la presencia de puentes de hidrógeno. Los resultados de acoplamiento demostraron que la interacción más favorable NQ-Kv1.3 ocurre con la metionina del asa extracelular 3 (A3) y junto con los resultados EF apuntan a que esta interacción es de tipo redox.

Una importante contribución de este trabajo es la estrategia experimental empleada en un intento de simular los ambientes celulares (hidrofóbico e hidrofílico) a los que la NQ se enfrenta cuando interacciona con el canal iónico. Esta estrategia puede ser utilizada de manera simple y fina para pre-seleccionar los mejores compuestos a ser evaluados mediante técnicas electrofisiológicas. El trabajo es pionero en el uso de técnicas electroquímicas y electrofisiológicas para intentar demostrar que el potencial redox y la estructura molecular de los compuestos están relacionados con la modulación del canal iónico rKv1.3.

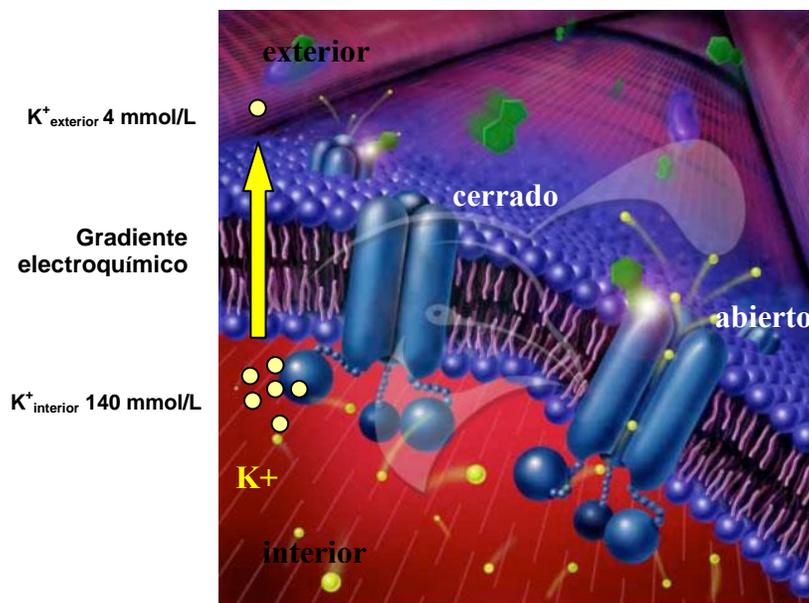
CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1. ELECTROFISIOLOGÍA

1.1.1. Canales Iónicos.

Los canales iónicos son proteínas integrales de la membrana que participan en la permeación iónica a través de la membrana celular. Debido a que el movimiento de cargas o iones a través de ellos genera corrientes, son los responsables de las propiedades eléctricas de las células.¹ Su efectividad en el transporte iónico es una de sus principales características, hasta 100 millones de iones/s pueden atravesarlos en forma pasiva.² Dependiendo del entorno, estas proteínas altamente selectivas pueden encontrarse en estado abierto o cerrado (figura 1.1). Sin embargo, su probabilidad de apertura (relación entre el tiempo total que un solo canal permanece en estado abierto y el tiempo de su registro) está regulada mediante diversos factores.



<https://engineering.purdue.edu/CMUXE>

Figura 1.1. Esquema de una membrana celular donde se muestran los canales iónicos en estado abierto, cerrado y la emulación del transporte iónico que se lleva a cabo a través de ellos.

1 Terlau, H; Stühmer, W. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Naturwiss.* 85 (1998) 437-444.
2 Hille, B. Ionic channels of excitable membranes (1992) Sinauer Associates, Sunderland Massachusetts.

Existen dos propiedades importantes que distinguen a los canales iónicos de otros poros de las membranas. La primera es que a diferencia de los poros acuosos los canales iónicos no permanecen siempre abiertos, ya que tienen un mecanismo de compuerta³ (o gating en inglés) que les permite estar abiertos brevemente y de nuevo volver a cerrarse. En los canales iónicos, la probabilidad de apertura es controlada por un sensor que puede ser eléctrico (1), químico (2, 3) o mecánico (4) que se activa en respuesta a estímulos (figura 1.2) como cambios en el potencial de membrana (canales voltaje-dependientes, 1), ligandos intra o extracelulares (canales ligando dependientes, 2 y 3 respectivamente) y estrés mecánico (canales mecanosensibles o de compuerta mecánica, 4).⁴

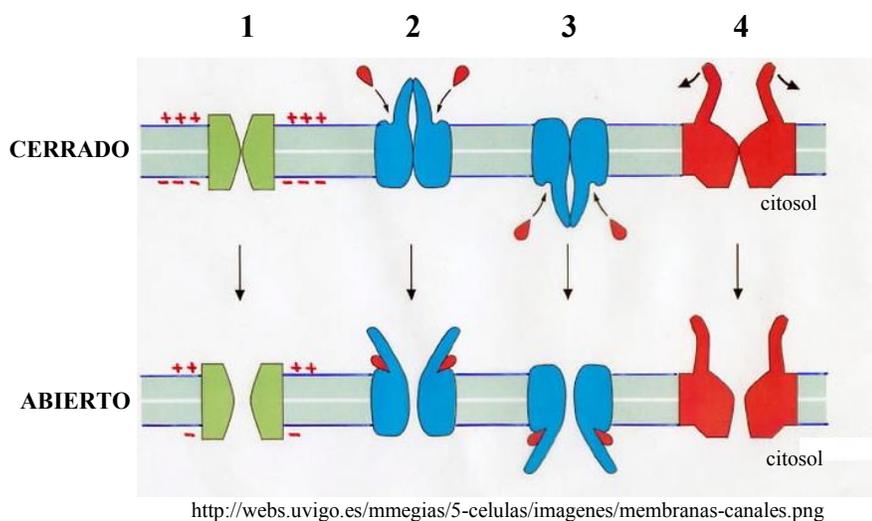


Figura 1.2. Esquema de estímulos que pueden activar al mecanismo de compuerta de los canales iónicos.
 1) Canales voltaje dependientes, 2, 3) Canales ligando dependientes extra e intracelulares y 4) Canales mecanosensibles

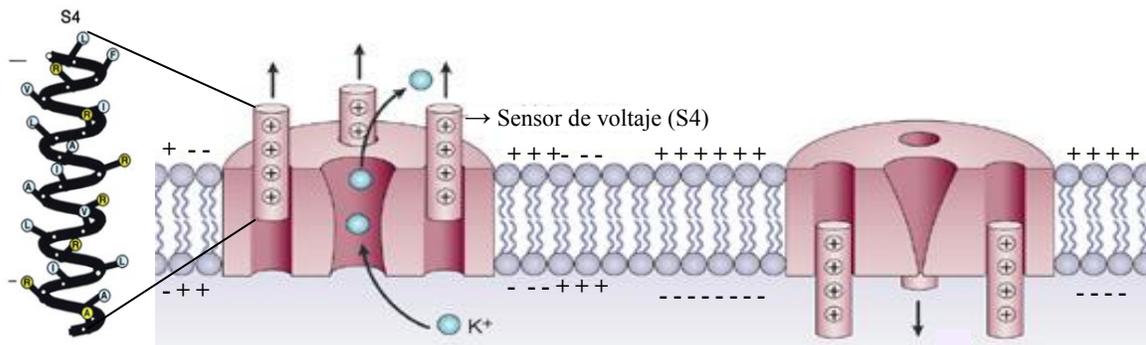
1. **Canales Voltaje Dependientes:** Los canales de Na^+ , K^+ , y Ca^{2+} presentes en los músculos y nervios presentan una probabilidad de apertura voltaje-dependiente es decir, que su mecanismo de compuerta se activa en respuesta a cambios en el potencial eléctrico de la membrana como la despolarización. Su principal función es la generación del potencial de acción en la célula. Este tipo de canales, tienen un dominio o segmento transmembranal (S) denominado sensor de voltaje⁵ (S4). Este S4 posee aminoácidos (aa) cargados positivamente como arginina (Arg) y lisina (Lys) cada tres posiciones y

3 Alberts B.; Bray D.; Lewis J.; Raff M.; Roberts K.; Watson J. (2002) Molecular biology of the cell, Garland Science, New York.

4 Sperelakis, N. (1998) Cell physiology, Academic Press, San Diego, California.

5 Jan, L.; Jan, N. Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annu. Rev. Neurosci.* 20 (1997) 91–123.

separados entre sí por aa hidrofóbicos. Debido a estas cargas y a la diferencia del potencial eléctrico en ambos lados de la membrana, el S4 es capaz de desplazarse hacia afuera o hacia adentro cuando el campo eléctrico de la membrana se modifica, efectuando así su mecanismo de compuerta⁶ (figura 1.3). El desplazamiento de S4 a su vez provoca un movimiento de cargas (corriente de compuerta) que altera la energía libre de la proteína y modifica su estructura terciaria induciendo a la apertura y/o cierre del canal.



<http://www.nature.com/nrd/journal/v3/n3/images>

Figura 1.3. Esquema del mecanismo de compuerta de los canales Voltaje-dependientes activado por el desplazamiento del Sensor de Voltaje (S4).

2, 3. Canales activados por ligandos: Su mecanismo de apertura, ocurre por la interacción de un ligando (neurotransmisores u otras moléculas) con una parte específica del canal o sitio receptor. Su sensor es una región expuesta ya sea al exterior o al interior de la membrana (2 y 3, figura 1.2 respectivamente) que une con gran afinidad al ligando. Esta unión, genera cambios en la energía libre de la proteína modificando su conformación dando como resultado la apertura del canal. Debido a que estos canales se abren en función de la concentración del mensajero, puede haber múltiples sitios de unión para lograr así el máximo estado abierto. Estas proteínas son importantes en la transmisión sináptica.

4. Canales de compuerta mecánica: Esta clase de canales, se abren en respuesta a una acción mecánica en la membrana, por ejemplo un estiramiento. Aunque el mecanismo no es claro aún, se ha propuesto que algunos ácidos grasos de la membrana pueden actuar como sensores mediante la activación de fosfolipasas unidas a la bicapa lipídica. O bien, estos

⁶ Caterral, W. Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology. *Neuron* 67 (2010) 915-928.

canales pueden estar acoplados a elementos elásticos de la estructura citoplasmática tales como la actina. Por otra parte, se ha sugerido que el sensor puede ser el propio citoesqueleto que se encuentra por debajo del canal.

La segunda característica que distingue a los canales iónicos es su selectividad iónica, ya que sólo permiten el libre paso de ciertos iones inorgánicos tales como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} o Cl^- y solo aquellos iones que tengan el tamaño y la carga apropiada, podrán pasar a través de ellos. La regulación de la concentración de estos iones, adquiere un papel importante en procesos fisiológicos celulares así como en el buen funcionamiento de los tejidos y órganos. El desequilibrio de los iones intra y extracelulares puede ser determinante para la supervivencia de un organismo.

La remarcada habilidad de los canales iónicos para combinar su exquisita selectividad iónica con su alta conductividad es fascinante. Este proceso, debe ser lo suficientemente ágil y rápido para enfrentar el reto frente a los iones y lo hacen mediante la adecuada orientación de ciertos aa de su estructura primaria y secundaria. La selectividad iónica de los canales, ocurre en el poro (P) constituido generalmente por cuatro unidades idénticas de S5 y S6, y un asa que los une formando un cono denominado filtro de selectividad.⁷ Esta cadena posee aa con alta densidad de carga negativa (por los átomos de oxígeno de sus carbonilos), que al estar orientados hacia el centro del poro provocan la atracción de cationes y repelen cargas negativas haciendo al canal selectivo para cationes. Cuando un ion K^+ (1.33 Å) entra al filtro de selectividad, pierde sus moléculas de solvatación debido a la orientación de los carbonilos que tienen el espacio y la distancia precisa para acomodarlo (figura 1.4) provocando así, que el K^+ interaccione únicamente con los 12–16 átomos de oxígeno alineados. El filtro de selectividad, es capaz de alojar un ión K^+ a lo ancho del poro y hasta dos o tres K^+ a lo largo del mismo. En contraste, un ion Na^+ (0.95 Å) no puede entrar al filtro debido a que los oxígenos están muy lejos y no se alcanza a compensar la energía asociada para la pérdida de moléculas de solvatación (figura 1.4).^{8,9}

7 Doyle, D.; Cabral, J.; Pfuetzner, R.; Kuo, A.; Gulbis, J.; Cohen, S.; Chait, B.; MacKinnon, R. The structure of the potassium channel: Molecular basis of K^+ conduction and selectivity. *Science*. 280 (1998) 69-77.

8 Miller, C. An overview of the potassium channel family. *Genome Biol.* 1 (2000) Rev 4.1- 4.5.

9 Miller, C. Ion channels: doing hard chemistry with hard ions. *Curr. Opin. Chem. Bio.* 4 (2000) 148-151.

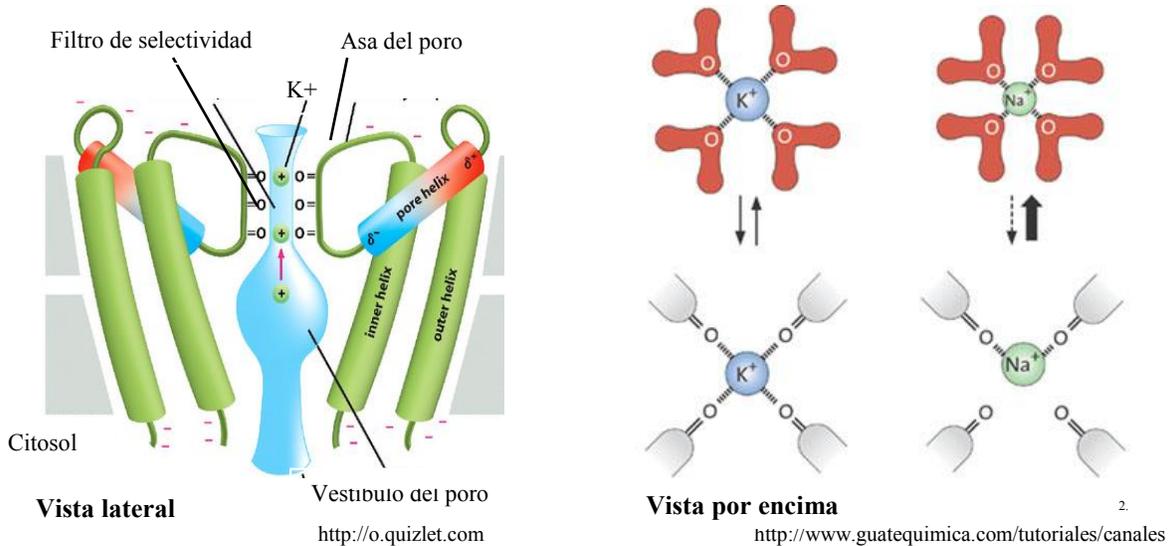


Figura 1.4. Esquema del filtro de selectividad de los canales de K^+ y la interacción de los iones K^+ en comparación con Na^+ .

1.1.2. Canales de Potasio K^+ .

Quizás los canales iónicos más comunes en las membranas plasmáticas de diversas células animales son los permeables a K^+ . Éstos, constituyen el grupo más heterogéneo de canales y juegan un papel importante en: el mantenimiento del potencial de reposo de la célula, la excitabilidad celular, transporte de electrolitos, contracción del músculo liso y regulación del volumen celular; así también, son importantes para la activación linfocitaria en la respuesta inmune. Estudios con la mosca *Drosophila melanogaster* de la fruta han sido clave para el establecimiento de la topología (estructura) y función de estos canales. El primer canal de K^+ identificado fue el Shaker (Sh),¹⁰ denominado así porque su activación provoca movimientos espasmódicos de las extremidades de la mosca al ser anestesiadas con éter (dSh). Un hecho importante es que algunos canales de K^+ se encuentran abiertos aún cuando no se han estimulado (estado de reposo) y por ello son llamados canales de fuga de K^+ . Debido a que la membrana plasmática es mucho más permeable al K^+ que a otros iones, estos canales tienen un rol crucial en el mantenimiento del potencial de membrana.

10 Ashcroft, F. Ion channels and disease. (2000) Academic Press, San Diego, California.

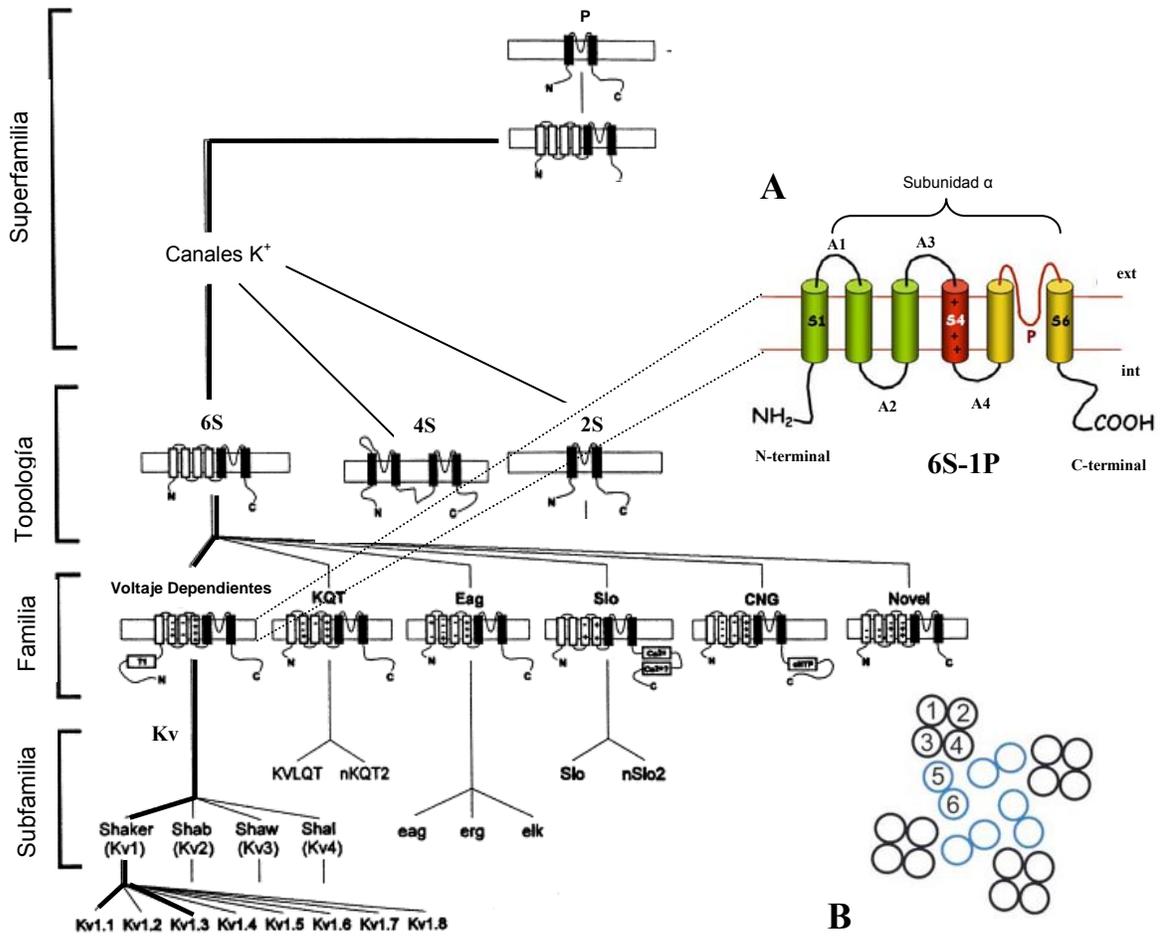


Figura 1.5 Clasificación de los canales de K⁺ de acuerdo a su topología. A) Representación esquemática de subunidad α . B) Arreglo transmembranal de un homotetrámero simétrico funcional.

La familia de los canales de K⁺ es la más grande y compleja, está representada por al menos 70 genes en el genoma humano.¹¹ Puede clasificarse de acuerdo a la topología de los S que presenta la subunidad α formadora del poro y sus propiedades biofísicas, están determinadas por el tipo de subunidad α que los conforman (figura 1.5).

En los canales 6S-1P de K⁺, los segmentos S1-S3 forman la interfase entre la membrana lipídica y el poro acuoso que está formado por S5 y S6.¹² A su vez, los S se encuentran

11 Gutman, G.; Chandy, K.; Grissmer, S.; Lazdunski, M. Mackinnon, D; Pardo, L.; Robertson, G.; Rudy, B.; Sanguinetti, M.; Stühmer, W.; Wang, X. International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev.* 57 (2005) 473-508.
 12 Yellen, G.; Keeping K⁺ completely comfortable. *Nat. Struct. Biol.* 8 (2001)1011-1013.

unidos entre sí mediante asas extra (A1 y A3) e intracelulares (A2 y A4).¹³ Los extremos N-terminal y C-terminal de este tipo de canales por lo general son citoplasmáticos y son responsables de la inactivación tipo N y C del canal respectivamente. La mayoría de los canales de K^+ tienen cuatro subunidades α agrupadas formando estructuras hetero u homotetraméricas simétricos funcionales (figura 1.5).^{2,14}

1.1.3. Canales de Potasio K^+ voltaje-dependientes (Kv).

Dentro de los canales de K^+ , la familia de los canales voltaje-dependientes o Kv es una de las más estudiadas. Los Kv a su vez, se dividen en cuatro subfamilias y la de interés en este trabajo es la Kv1. Esta subfamilia, debe su importancia a la gran variedad de funciones fisiológicas en las que están involucrados, así como a su presencia en diversos órganos importantes incluyendo cerebro, pulmón y riñón. El Kv1.1 (homólogo del dSh) y el Kv1.3, dos de los siete miembros de la subfamilia Kv1, juegan un papel fundamental en la regulación de la excitabilidad de las membranas celulares debido a que están involucrados con la repolarización del potencial de acción.

En los últimos años, se ha intentado describir la asociación de enfermedades y la presencia de mutaciones en los genes que codifican para los canales iónicos, denominándolas canalopatías.¹⁵ Diversos autores se han dado a la tarea de demostrar que el Kv1.3 es un objetivo potencial para la lucha contra enfermedades autoinmunes^{16,17} como la esclerosis múltiple,^{18,19} la diabetes tipo 1,^{20,21} la alopecia areata,²² psoriasis²³ y la artritis reumatoide.²⁴

13 MacKinnon, R.; Miller, C.; Mutant potassium channels with altered binding of charybdotoxin, a pore-blocking peptide inhibitor. *Science* 245 (1989) 1382-1385.

14 Li-Smering, Y.; Hackos, D.; Swartz, K. A localized interaction surface for voltage-sensing domains on the pore domain of a K^+ channel. *Neuron* 25 (2000) 411-423.

15 Shieh, C.; Coghlan, M.; Sullivan, J.; Gopalakrishnan, M. Potassium channels: Molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharm. Rev.* 52 (2000) 557-593

16 Wang, J.; Xiang, M. Targeting potassium channels Kv1.3 and $KCa3.1$: Routes to selective immunomodulators in autoimmune disorder treatment? *Pharmacotherapy* 33 (2013) 515-528.

17 Chen, R.; Chung, S. Engineering a potent and specific blocker of voltage-gated potassium channel Kv1.3, a target for autoimmune diseases. *Biochem.* 51 (2012) 1976-1982.

18 Rangaraju, S.; Chi, V.; Pennington, M. Kv1.3 potassium channels as a therapeutic target in multiple sclerosis. *Expert Opin Ther Targets.* 13 (2009) 909-924.

19 Rus, H.; Pardo, C.; Hu, L.; Darrah, E.; Cudrici, C.; Niculescu, T.; Niculescu, F.; Mullen, K.; Allie, R.; Guo, L.; Wulff, H.; Beeton, C.; Judge, S.; Kerr, D.; Knaus, H.; Chandy, K.; Calabresi, P. The voltage-gated potassium channel Kv1.3 is highly expressed on inflammatory infiltrates in multiple sclerosis brain. *Proc Natl Acad Sci.* 102 (2005) 11094-11099.

20 Choi, B.; Hahn, S. Kv1.3: a potential pharmacological target for diabetes. *Acta Pharmacol Sin.* 31 (2010) 1031-1035.

Se ha observado que en estos trastornos, las células T de memoria expresan niveles más altos de Kv1.3, por lo que bloqueadores específicos de este canal ofrecen una nueva y valiosa opción terapéutica para estas enfermedades.

Existen compuestos capaces de activar, inhibir o modular de manera selectiva el funcionamiento de los canales iónicos de potasio a través de diferentes mecanismos; sin embargo, poco se conoce acerca de la modulación de estos canales mediante compuestos con características redox.^{25,26} Se ha demostrado que toxinas como la caribdotoxina,²⁷ kaliotoxina²⁸ y margatoxina²⁹ bloquean al Sh y al Kv1.3, principalmente por acoplamiento a residuos de aa ácidos en el vestíbulo del poro (ácido glutámico y aspártico, Glu422 y Asp386) que provoca alteraciones especialmente en el filtro de selectividad. Vasodilatadores como la ketanserina³⁰ y el verapamilo³¹ bloquean al Kv1.3 y modifican su inactivación tipo-C. La mutación de una metionina (Met395) que se encuentra en la parte interna del poro, disminuye el efecto del verapamilo hasta 6 veces en Kv1.3 mientras que en Sh se modifica hasta 10 veces. Moléculas más pequeñas como el tetraetilamonio³² pueden bloquear a estos canales gracias a su afinidad con la treonina (Thr449) y con otros aa del vestíbulo del poro. Otras como la quinidina, se acoplan y estabilizan mediante

-
- 21 Toldi, G.; Vásárhelyi, B.; Kaposi, A.; Mészáros, G.; Pánczél, P.; Hosszúfalusi, N.; Tulassay, T.; Treszl, A. Lymphocyte activation in type 1 diabetes mellitus: The increased significance of Kv1.3 potassium channels. *Immunology Letters* 133 (2010) 35-41.
 - 22 Gilhar, A.; Keren, A.; Shemer, A.; Ullmann, Y.; Paus, R. Blocking potassium channels (Kv1.3): A new treatment option for alopecia areata? *Journal of Investigative Dermatology* 133 (2013) 2088-2091.
 - 23 Nguyen, W.; Howard, B.; Neale, D.; Thompson, P.; White, P.; Wulff, H.; Manallack, D. Use of Kv1.3 blockers for inflammatory skin conditions. *Curr Med Chem.* 17 (2010) 2882-2896.
 - 24 Toldi, G.; Bajnok, A.; Dobi, D.; Kaposi, A.; Kovács, L.; Vásárhelyi, B.; Balog, A. The effects of Kv1.3 and IKCa1 potassium channel inhibition on calcium influx of human peripheral T lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Immunobiology* 218 (2013) 311-316.
 - 25 Chen, J.; Avdonin, V.; Ciorba, M.; Heinemann, S.; Hoshi, T. Acceleration of P/C-type inactivation in voltage-gated K1 channels by methionine oxidation. *Biophys. J.* 78 (2000) 174-187.
 - 26 Ciorba, M.; Heinemann, S.; Weissbach, H.; Brot, N.; Hoshi, T. Regulation of voltage-dependent K channels by methionine oxidation: effect of nitric oxide and vitamin C. *FEBS Lett.* 442 (1999) 48-52
 - 27 MacKinnon, R.; Heginbotham, L.; Abramson, T. Mapping the receptor site for charybdotoxin, a pore-blocking potassium channel inhibitor. *Neuron* 5 (1990) 767-771.
 - 28 Abbas, N.; Belghazi, M.; Mottaleb, Y.; Tytgat, J.; Bougis, P.; Martin-Eauclaire, M. A new kaliotoxin selective towards Kv1.3 and Kv1.2 but not Kv1.1 channels expressed in oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 376 (2008) 525-530.
 - 29 Aiyar, J.; Withka, J.; Rizzi, J.; Singleton, D.; Andrews, G.; Lin, W.; Boyd, J.; Hanson, D.; Simon, M.; Dethlefs, B.; Lee, C.; Hall, J.; Gutman, G.; Chandy, K. Topology of the pore-region of a K⁺ channel revealed by the NMR-derived structures of Scorpion Toxins. *Neuron* 15 (1995) 1169-1181.
 - 30 Wang, X.; Liao, Y.; Zou, A.; Li, L.; Tu, D. Blockade action of ketanserin and increasing effect of potassium ion on Kv1.3 channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Pharm. Res.* 56 (2007) 148-154.
 - 31 Rauer, H.; Grissmer, S. The effect of deep pore mutations on the action of phenylalkylamines on the Kv1.3 potassium channel. *British. J. Pharm.* 127 (1999) 1065-1074.
 - 32 Molina, A.; Castellano, A.; Lopez-Barneo, J. Pore mutations in Shaker K⁺ channels distinguish between the sites of tetraethylammonium blockade and C-type inactivation. *J. Physiol.* 499 (1997) 361-367.

interacciones hidrofóbicas con treoninas (Thr505 y Thr512) presentes en la cara interna del poro en S6.³³ Una mutación Shaker (Thr449Cys) demostró que éste puede inhibirse por la parte externa en presencia de Zn^{2+} y Cd^{2+} a través de interacciones directas con la cisteína expuesta.³⁴ Por otra parte, se ha observado que Shaker conserva dos residuos de cisteínas (Cys301 y Cys308) en la parte más baja de S1 y S6 que por su posición y cercanía, pueden formar puentes disulfuro cuando se exponen a condiciones oxidantes por la parte interna del canal, lo que provoca cambios conformacionales de la estructura tetramérica del canal que modifican drásticamente su actividad.^{35,36}

Con base en lo anterior podría suponerse que, la alteración de algunos residuos en la estructura primaria de la proteína es suficiente para generar cambios conformacionales que modifican significativamente el mecanismo de compuerta del canal. Por otra parte, los compuestos que tienen un efecto selectivo sobre los canales iónicos se usan como herramientas para ampliar el estudio de sus funciones y el papel que juegan en las células en las que se expresan. También es posible emplearlos con el fin de controlar su función *in vivo*, como principios activos de medicamentos. Entonces, el descubrimiento de nuevos compuestos, así como su mecanismo modulador sobre los canales iónicos y utilizarlos para comprender sus propiedades funcionales y estructurales, sigue siendo un reto y un hallazgo por demás interesante.

1.1.4. Flujo iónico en la membrana y la ecuación de Nernst.

Muchas de las propiedades biofísicas que se conocen de los canales K_v , provienen de estudios que miden el flujo iónico de K^+ que pasa a través de estas proteínas como una corriente eléctrica en respuesta a cambios en el potencial de la membrana celular. Cuando existe una diferencia de carga eléctrica entre el interior y exterior de la membrana celular

33 Yeola, S.; Rich, T.; Uebele, V.; Tamkun, M.; Snyder, D. Molecular analysis of a binding site for quinidine in human cardiac delayer rectifier K^+ channel. *Circ. Res.* 78 (1996) 1105-1114.

34 Yellen, G.; Sodickson, D.; Chen, T.; Jurman, M. An engineered cysteine in the external mouth of a K^+ channel allows inactivation to be modulated by metal binding. *Biophysical Journal* 66 (1994) 1068-1075.

35 Schulteis, C.; John, S.; Huang, Y.; Tang, C.; Papazian, D. Conserved cysteine residue in the Shaker K^+ channel is not linked by disulphide bond. *Biochem* 34 (1995) 1725-1733.

36 Schulteis, C.; Nagoya, N.; Papazian, D. Intersubunit interaction between amino- and carboxyl-terminal cysteine residues in tetrameric Shaker K^+ channels. *Biochem* 35 (1996) 12133-12140.

debido a un ligero exceso de iones,³⁷ se genera una diferencia de potencial (E) entre ambos lados de la bicapa lipídica que se conoce como potencial de membrana o E_m ($E_m = E_i - E_e$, interno y externo). En general, se considera al E_e como un potencial a tierra (0 mV) que hace que el E_m sea simplemente el E_i . Cuando una célula se encuentra en reposo el E_m se denomina potencial de membrana en reposo (E_r) y si la célula recibe un estímulo, determinados canales se abren provocando el flujo iónico que altera este potencial.

En células animales, la mayor contribución al E_m ocurre de forma pasiva a través de los canales iónicos mientras que proteínas de transporte activo, ayudan a conservar el balance osmótico por ejemplo, manteniendo la concentración intracelular de Na^+ baja ($[\text{Na}^+]_i$: 10 mM, $[\text{Na}^+]_e$: 140 mM). Debido a esto, cationes intracelulares como el K^+ deben estar presentes en abundancia ($[\text{K}^+]_i$: 140 mM, $[\text{K}^+]_e$: 4 mM) para el balance de cargas positivas. El K^+ entonces, es transportado de manera activa por la bomba de Na^+/K^+ y de forma pasiva a través de los canales de fuga,³ lo que genera un flujo iónico que se mantendrá hasta que exista un ligero aumento de cargas positivas fuera de la célula. En ese momento, el Na^+ comenzará a entrar (por su gradiente de concentración) y provocará una despolarización de la membrana, es decir, E_m se hace menos negativo con respecto al potencial de equilibrio del K^+ y por lo tanto, dejará de estar en equilibrio favoreciéndose así su salida (figura 1.6). Finalmente, cuando el E_m llega al reposo, la salida de K^+ equilibra exactamente la entrada del Na^+ . A esta condición de equilibrio, no hay flujo neto a través de la membrana y se define como potencial de mantenimiento de la célula (E_H , Holding potential en inglés) y la ecuación de Nernst la expresa de forma cuantitativa.

37 Bartlett P. Bioelectrochemistry. Fundamentals, experimental techniques and applications. (2008) John Wiley & sons, Wiltshire, England.

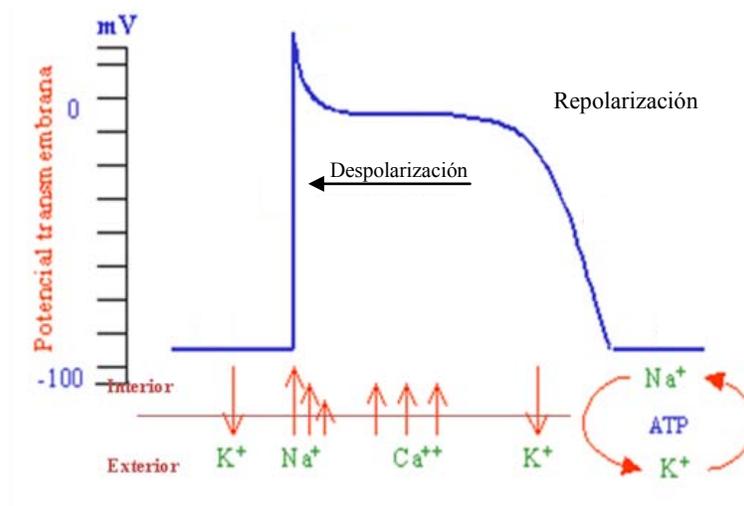


Figura 1.6. Esquema que representa el flujo de iones involucrados en el establecimiento del potencial de membrana.

El transporte pasivo de iones a través de los canales representa la combinación de dos influencias: el E_m y la concentración C de iones extra e intracelular (C_e y C_i , respectivamente). Cuando estos dos factores llegan a un balance de ambos lados de la membrana, el gradiente electroquímico para un ión en particular es de cero y se considera que no hay un flujo neto a través de la proteína. El gradiente de voltaje en este balance, se conoce como potencial de equilibrio del ión y se explica en términos de la concentración mediante la ecuación de Nernst (ecuación 1.1).

$$E_i - E_e = \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_e}{C_i} \quad \text{ecuación 1.1}$$

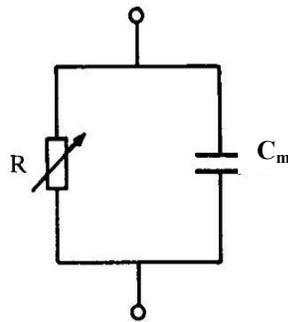
Donde R es la constante de los gases ($2 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T es la temperatura absoluta (Kelvin), F es la constante de Faraday ($2.3 \times 10^4 \text{ cal V}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) y z es la carga del ion. Para un ión univalente tenemos que $2.3 \cdot (RT/zF)$ es 58 mV a 20°C y 61.5 mV a 37°C . Cuando $C_e/C_i=10$, el valor de potencial de equilibrio toma un valor de 61.5 mV , mientras que para $C_e/C_i=1$ toma un valor de cero. Tomando como ejemplo al ión K^+ , en diversas células mamíferas la $[\text{K}^+]_i > [\text{K}^+]_e$ (140 mM y 5 mM respectivamente), por lo que el K^+ tiende a salir por un gradiente de concentración. El potencial de equilibrio calculado para el K^+ a estas condiciones es de -89 mV . Este potencial negativo resulta en un campo eléctrico que apunta hacia el interior conduciendo a la entrada de K^+ . Las dos fuerzas, el gradiente

químico saliente y el campo eléctrico entrante, se cancelan resultando un nulo flujo iónico a través de la membrana (potencial de equilibrio de K^+).

1.1.5. Técnica de Fijación de Voltaje con dos electrodos (TEVC).

Las consideraciones arriba descritas, juegan un papel importante cuando se realiza una de las técnicas electrofisiológicas más utilizadas, la Técnica de Fijación de Voltaje (Voltage Clamp, en inglés). Esta técnica, permite medir el flujo de iones que pasan a través de la membrana celular (por los canales iónicos) como una corriente eléctrica, mientras que el potencial de la membrana se mantiene controlado durante el experimento.³⁸

La fijación del voltaje puede entenderse fácilmente considerando a la membrana celular como un circuito eléctrico simple equivalente a la membrana celular (figura 1.7). En el circuito, C_m representa a la capacitancia de la membrana (capacidad que posee la membrana para mantener una carga eléctrica almacenada) mientras que la variable R_Ω , o resistencia, representa a los canales iónicos que permiten el paso de corrientes iónicas. La corriente membranal (I_m) entonces, será la suma de dos términos: la corriente iónica (I_i) por los iones que atraviesan a través de la membrana y corriente capacitiva (I_{CC}) generada por cargas eléctricas acumuladas en la membrana celular según la siguiente expresión:



$$I_m = I_i + I_{CC} = I_i + C_m \frac{dE}{dt} \quad \text{ecuación 1.2}$$

Figura 1.7. Circuito eléctrico simple análogo de la membrana celular.

38 Halliwell J.; Plant T.; Robbins J.; Standen N. Voltage clamp techniques. Microelectrodes techniques. (1994) The company of Biologists, Cambridge, 17-35.

En un experimento típico de fijación de voltaje, el E_m se modifica desde el E_H (cercano al valor de reposo) hasta un valor más despolarizado durante milisegundos y posteriormente, se regresa al E_H generando un pulso de potencial cuadrado (figura 1.8A).

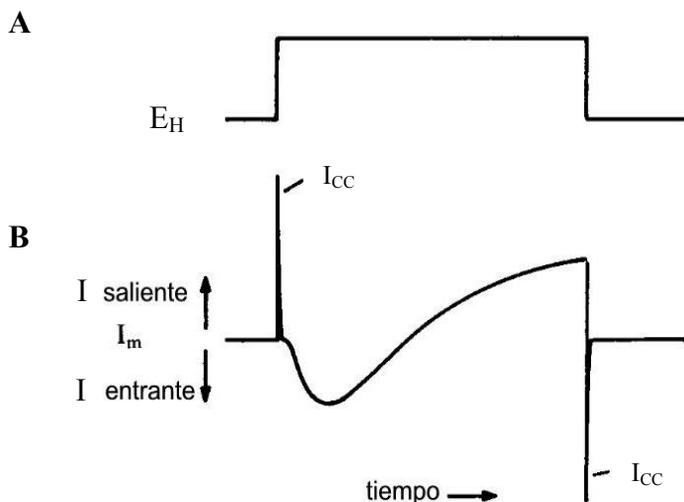


Figura 1.8. (A) Pulso de potencial cuadrado. (B) Corrientes típicas registradas de una célula excitable en condiciones de fijación de voltaje.

Bajo estas condiciones, se observan picos de corriente I_{CC} debido a la capacitancia de la membrana. Cuando el voltaje se mantiene constante, el valor de dE/dt es cero y por lo tanto I_{CC} vale cero, entonces la I_i se obtiene libre del aporte capacitivo o transientes capacitivos (figura 1.8B). Durante el pulso de potencial constante, se pueden observar I_i debido a la entrada y/o salida de iones denominadas como corrientes entrantes y/o salientes respectivamente. En la mayoría de los experimentos, las I_i son las que proporcionan información acerca de las propiedades de permeabilidad de los canales iónicos y los mecanismos de apertura.

Uno de los modos de esta técnica es la denominada fijación de voltaje con dos electrodos (TEVC en inglés Two-Electrodes Voltage Clamp) y para ello, se emplean comúnmente células esféricas y pequeñas que son penetradas con dos capilares pulidos y estirados al calor que en su interior contienen una disolución de KCl saturada y alambres de Ag° previamente clorurados (microelectrodos). El sistema de registro (figura 1.9) consta de un amplificador de retroalimentación que recibe la señal del electrodo que registra el voltaje (V) y lo compara con un potencial comando que se aplica para modificar el potencial de

membrana. La diferencia entre ambas señales se amplifica y se aplica a la membrana como corriente a través del segundo electrodo y de un electrodo de referencia que se encuentra en el baño conectado a tierra (E_t).

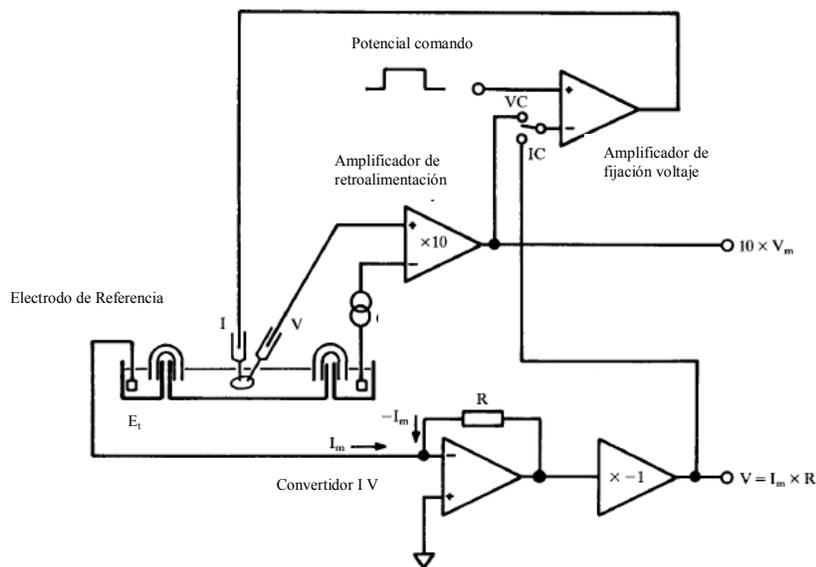


Figura 1.9. Diagrama del circuito empleado en la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos.

Para el registro, se deben utilizar electrodos cuya resistencia varíe de 0.15 hasta 0.3 M Ω y entre mayor es la resistencia más rápida es la velocidad de fijación de voltaje. Los micro electrodos, se insertan dentro de la célula con la ayuda de un microscopio estereoscópico y micro manipuladores. La penetración del electrodo así como su manipulación, se monitorea en el modo de fijación de corriente. En este modo, ambos electrodos registran el E_m por la desviación del potencial eléctrico y sólo después de la penetración de los dos electrodos el amplificador se cambia al modo de fijación de voltaje. Debido al delicado trabajo, el sistema debe montarse sobre una plataforma anti vibraciones para evitar que las oscilaciones dañen a la célula en el sitio de implantación de los electrodos. Ya que las corrientes a medir son del orden de nA, debe utilizarse una caja de Faraday para eliminar cualquier campo electromagnético en el ambiente. Las corrientes se miden con un amplificador y se registran con una interfase analógico-digital conectada a una computadora para almacenar y analizar los registros.

1.1.6. Ovocitos de *Xenopus laevis* como modelo biológico.

Típicamente, para los experimentos por TEVC, se utilizan como células de prueba los ovocitos de ranas africanas *Xenopus laevis* ya que son células relativamente grandes (aproximadamente 1mm de diámetro) fáciles de manejar y conseguir. Además, son muy útiles para efectuar estudios en el área de biología del desarrollo, señalización intracelular, rutas metabólicas y fenómenos relacionados con el transporte.

Los ovocitos de *X. laevis* presentan diversas fases de desarrollo (etapas I – VI) en donde las principales diferencias visibles entre éstas son el tamaño del huevo (100 μm y 1300 μm respectivamente) y la pigmentación (que va desde incoloro hasta dos hemisferios: el polo animal de color marrón y el polo vegetal de color beige). Durante su desarrollo (ovogénesis), los ovocitos acumulan ribosomas, albúmina, glucógeno, lípidos y ARNm “mensajero materno” que se encarga de regular la síntesis de proteínas y el desarrollo temprano del embrión.^{39,40} Se ha demostrado, que los ovocitos de *X. laevis* son capaces de sintetizar hemoglobina después de la inyección de ARNm de esta proteína.⁴¹ Esta es una razón de peso para utilizarlos como células modelo para la expresión heteróloga de otras proteínas como los canales iónicos. Generalmente, se utilizan las células en etapas V-VI ya que poseen de 1 a 1.3 mm de diámetro y pueden ser fácilmente manipuladas. Otra ventaja que ofrece el uso de ovocitos de *X. laevis* en ensayos electrofisiológicos (EF) además de su habilidad para traducir eficientemente ARNm exógenos, su tamaño y resistencia, es que presentan muy poca cantidad de sistemas de transporte endógenos comparados con los que producen los canales expresados;⁴² lo que hace que el ruido de fondo con respecto a las proteínas heterólogas, sea casi despreciable. Entonces, es un hecho que se deben manipular de manera extracelular a éstas células para que generen las proteínas de interés y para ello, los ovocitos son inyectados con ARNm de proteínas obtenidas mediante técnicas convencionales de biología molecular.

39 Stuhmer, W. Electrophysiologic recordings from *Xenopus* oocytes. *Meth. in Enzymol.* 293 (1998) 280–300.

40 Stuhmer, W. Electrophysiological recordings from *Xenopus* oocytes. *Meth. in Enzymol.* 207 (1992) 319–339.

41 Gurdon J.; Lane, C.; Woodland, H.; Mairbaix, G. Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 233 (1971) 177-182.

42 Weber. M. Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochim Biophys Acta.* 1421 (1999) 213-233.



Figura 1.10. Ranas hembras *Xenopus laevis* (izquierda) y ovocitos en etapas V-VI (derecha).

1.2. QUINONAS

Las quinonas (Q), son compuestos orgánicos de sustancial interés farmacológico. A través de los años, han aparecido en la literatura diversos informes sobre sus actividades biológicas, farmacológicas y toxicológicas. Su bioactividad generalmente está relacionada principalmente vía dos mecanismos: primero, como aceptores de tipo Michael provocando la unión a nucleófilos celulares que conlleva a la alquilación de proteínas y ADN. En segundo lugar, como un agente redox que genera especies reactivas de oxígeno.

Desempeñan un papel integral en los procesos de transferencia de electrones que mantienen las funciones biológicas de las plantas y los animales. Por ejemplo, la plastoquinona⁴³ está involucrada en reacciones fotosintéticas en las plantas; mientras que la ubiquinona en los animales, actúa como electrotransportador en el proceso de respiración celular y producción de energía en la mitocondria.⁴⁴ Otras quinonas como la menadiona o vitamina K tienen un papel importante en la coagulación de la sangre y en el metabolismo óseo.⁴⁵ Además de estar involucradas en estos procesos, las quinonas han tenido una amplia variedad en la práctica clínica y la aplicación industrial. La doxorubicina es un antibiótico usado en el tratamiento de tumores malignos,^{46,47} mientras que otros derivados de antraquinonas tienen

43 Krogmann, D.; Olivero, E. The specificity of plastoquinone as a cofactor for photophosphorylation. *J. Biol. Chem.* 237 (1962) 3292-3295.

44 Navas, P.; Villalba, J.; Cabo, R. The importance of plasma membrane coenzyme Q in aging and stress response. *Mitochondrion*, 7S (2007) S34-S40.

45 Card, D.; Gorska, R.; Cutler J.; Harrington D. Vitamin K metabolism: Current knowledge and future research. *Mol. Nutr. Food Res.* (2013) 1-11.

46 Sun, C.; Dou, S.; Du, J.; Yang, X.; Li, Y.; Wang, J. Doxorubicin conjugate of poly(ethylene glycol)-block-polyphosphoester for cancer therapy. *Adv Health. Mater.* (2013)

efectos inmunosupresores y antiinflamatorios como el principio activo del ruibarbo.⁴⁸ Además presentan actividad anticancerígena,⁴⁹ antiprotozoaria,⁵⁰ bactericida⁵¹ y fungicida.⁵²

Las quinonas, promueven el estrés oxidativo⁵³ y en algunos casos, pueden reaccionar con residuos de metionina y cisteína de las proteínas^{54,55} por lo que su actividad puede modificarse drásticamente.^{56,57} Debido a que en las membranas celulares los procesos de transducción de señales dan lugar a compuestos con actividad oxidante, la presencia y o ausencia de compuestos redox podría ser un mecanismo modulador importante de proteínas tales como los canales iónicos. Para estos casos, los métodos electroquímicos podrían jugar un papel considerable en el descubrimiento de sus mecanismos ya que la caracterización electroquímica de proteínas de membrana es complicada debido a su naturaleza anfífilica.⁵⁸

Por otra parte, es razonable que la acumulación de quinonas en el organismo conduzca a condiciones patológicas como resultado de la generación de especies reactivas de oxígeno

-
- 47 Cambón, A.; Rey-Rico, A.; Mistry, D.; Brea, J.; Loza, M.; Attwood, D.; Barbosa, S.; Alvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A.; Taboada, P.; Mosquera, V. Doxorubicin-loaded micelles of reverse poly(butylene oxide)-poly(ethylene oxide)-poly(butylene oxide) block copolymers as efficient "active" chemotherapeutic agents. *Int J Pharm.* 10 (2013) 47-57.
- 48 Choi, R.; Ngoc, T.; Bae, K.; Cho, H.; Kim, D.; Chun, J.; Khan, S.; Kim, Y. Anti-inflammatory properties of anthraquinones and their relationship with the regulation of P-glycoprotein function and expression. *Eur J Pharm Sci.* 23 (2013) 272-281.
- 49 Bachur, N.; Gordon, S.; Gee, M. A general mechanism for microsomal activation of quinone anticancer agents to free radicals. *Cancer Res.* 38 (1978) 1745-1750.
- 50 Goulart, M.; Zani, C.; Tonholo, J.; Freitas, L.; de Abreu, F.; Oliveira, A.; Raslan, D.; Starling, S.; Chiari, E. Trypanocidal activity and redox potential of heterocyclic and 2-hydroxy-naphthoquinones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (1997) 7, 2043-2048.
- 51 Shen, C.; Syu, W.; Li, S.; Li, Ch.; Lee, G.; Sun, Ch. Antimicrobial activities of naphthazarins from *Arnebia euchrona*. *J Nat. Prod.* 65 (2002) 1857-1862.
- 52 Meazza, G.; Dayan, F.; Wedge, D. Activity of quinones on *Colletotrichum* species. *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 3824-3828.
- 53 Fisher, A.; Labenski, M.; Malladi, V.; Gokhale, M.; Bowen, R.; Milleron, S.; Bratton, T.; Monks, S.; Lau, S. Quinone electrophiles selectively adduct "Electrophile binding motifs" within cytochrome c. *Biochem.* 47 (2007) 11090-110100.
- 54 Shechter, Y. Selective oxidation and reduction of methionine residues in peptides and proteins by oxygen exchange between sulfoxide and sulfide. *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 66-70.
- 55 Evanst, M.; Pryor, W.; Damage to human a-l-proteinase inhibitor by aqueous cigarette tar extracts and the formation of methionine sulfoxide. *Chem. Res. Toxicol.* 5 (1992) 654-660.
- 56 Schulteis, C.; John, S.; Huang, Y.; Tang, C.; Papazian, D. Conserved cysteine residue in the Shaker K⁺ channel is not linked by disulphide bond. *Biochem.* 34 (1995) 1725-1733.
- 57 Brot, N.; Weissbach, H. Biochemistry and physiological role of methionine sulfoxide residues in proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 223 (1983) 271-281
- 58 Melin, F.; Hellwing, P. Recent advances in the electrochemistry and spectroelectrochemistry of membrane proteins. *Biol. Chem.* 394 (2013)593-609.

induciendo daño oxidativo como la peroxidación de lípidos.^{59,60} Diversos autores han demostrado que la estabilidad y reactividad de los radicales generados están determinadas por el grupo funcional quinona. Éste, se modifica por sustituyentes en el anillo que le confiere efectos electroattractores y electrodonadores de gran importancia. Por ejemplo, se ha demostrado que la 9,10-fenantrenoquinona inhibe a la enzima óxido nítrico sintetasa deshidrogenasa gliceraldehído-3-fosfato (GAPDH) por la unión covalente al sitio activo de la enzima.^{61,62} También, se ha descrito que cuando se reducen las quinonas pueden interactuar con moléculas cruciales tales como ADN y proteínas.⁶³

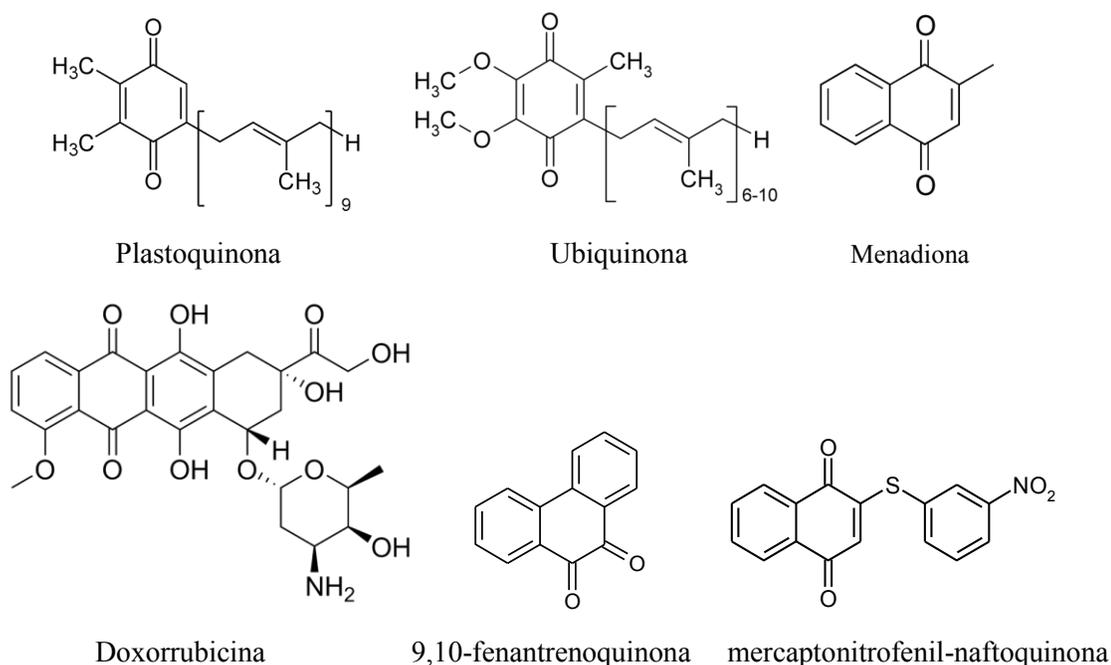


Figura 1.11. Estructuras de algunas quinonas.

59 Jacob, R.; Aleo, M.; Self-Medlin, Y.; Doshna, C.; Mason, R. 1,2-naphthoquinone stimulates lipid peroxidation and cholesterol domain formation in model membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1 (2013) 7189-7197.

60 Baghiani, A.; Charef, N.; Djarmouni, M.; Saadeh, H.; Arrar, L.; Mubarak, M. Free radical scavenging and antioxidant effects of some anthraquinone derivatives. *Med Chem.* 6 (2011) 639-644.

61 Miura, T.; Shinkai, Y.; Hirose, R.; Iwamoto, N.; Cho, A.; Kumagai, Y. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a quinone reductase in the suppression of 1,2-naphthoquinone protein adduct formation. *Free Radic Biol Med.* 51 (2011) 2082-2089.

62 Rodriguez, C.; Fukuto, J.; Taguchi, K.; Froines, J.; Cho, A. The interactions of 9,10-phenanthrenequinone with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), a potential site for toxic actions. *Chemico-Biological Interactions* 155 (2005) 97-110.

63 Thorna, C.; Oshiroa, C.; Marshe, S.; Hernandez-Boussard, T.; McLeodd, H.; Kleina, T.; Altmana, R. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics* 21 (2011) 440-446.

Se ha propuesto que la presencia de 1,4-naftoquinona induce la depolarización de la membrana del poro de permeabilidad mitocondrial (MTP, por sus siglas en inglés); mientras que la menadiona, aumenta la probabilidad de apertura del mismo.^{64,65,66} Los experimentos sugieren que los efectos observados, se deben a la interacción de las quinonas con grupos sulfidrilos hiperreactivos característicos del MTP, que llevan a la formación de enlaces disulfuro y favorecen la apertura de dicho poro. Sin embargo, el mecanismo de formación no se ha establecido aún. Quinonas como la mercaptonitrofenil-naftoquinona inhiben al Maxicanal o BK⁶⁷ (canal de potasio activado por voltaje, regulado por Ca²⁺ y de máxima conducción) que a su vez, se activa en presencia de reductores de origen natural como el timol, diosgenina,⁶⁸ el éster fenílico del ácido caféico⁶⁹ y otros alcoholes primarios⁷⁰ que funcionan como antioxidantes en sistemas biológicos. Interesantemente el hecho de que extracelularmente agentes reductores (derivados del fenol) activen al BK, mientras que agentes oxidantes (derivados de la 1,4-naftoquinona) lo inhiban, sugiere que las propiedades redox de estos compuestos podrían estar íntimamente relacionadas con la modulación de la actividad del BK e inclusive de otros canales voltaje dependientes.

Se ha demostrado que en complejos enzimáticos fotosintéticos, se llevan a cabo dos mecanismos para generar el gradiente electroquímico de protones acoplado y necesario para la cadena de electrones. Uno de ellos, es la translocación de protones previa a la transferencia de electrones, como ocurre en la citocromo oxidasa. El segundo, es la oxidación/reducción de hidroquinona que genera protones, como en citocromo b₆f. Cramer

64 Constantini, P.; Boris, V.; Petronilli, V.; Bernardi, P. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites. *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 6746-6751.

65 Palmeira, C.; Wallace, K. Benzoquinone inhibits the voltage-dependent induction of the mitochondrial permeability transition caused by redox-cycling naphthoquinones. *Tox. Appl. Pharm.* 143 (1997) 338-347.

66 Feng, W.; Liu, G.; Xia, R.; Abramson, J.; Pessah, I. Site-selective modification of hyperreactive cysteines of ryanodine receptor complex by quinones. *Mol. Pharma.* 55 (1999) 821

67 Huang, M.; Wu, S.; Shen, A. Inhibition of Ca²⁺-activated and voltage-dependent K⁺ currents by 2-mercaptophenyl-1,4-naphthoquinone in pituitary GH3 cells. Contribution to its antiproliferative effect. *Life Sci.* 70 (2002) 1185-1203.

68 Wang, Y.; Liu, Y.; Chang, H.; Wu, S. Diosgenin, a plant-derived sapogenin, stimulates Ca²⁺-activated K⁺ current in human cortical HCN-1A neuronal cells *Planta Med.* 72 (2006) 430-436.

69 Lin, M.; Yang, S.; Huang, M.; Wu, S. Stimulatory actions of caffeic acid phenethyl ester, a known inhibitor of NF- κ B activation, on Ca²⁺-activated K⁺ current in pituitary GH3 cells. *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 26885-26992.

70 McManus, O.; Harris, G.; Giangiacomo, K.; Feigenbaum, P.; Reuben, J.; Addy M.; Burka, J.; Kaczorowski, G.; Garcia, M. An activator of calcium-dependent potassium channels isolated from a medicinal herb. *Biochem.* 32 (1993) 6128-6133.

y colaboradores⁷¹ demostraron que en este complejo, la conducción de protones ocurre por una transferencia vía Asp20 y Arg207 hacia la quinona mediada por enlaces de hidrógeno.

Por otra parte, se ha informado que la ubiquinona del complejo mitocondrial Coq10 presente en *S. cerevisiae*, se acomoda específicamente en la región Phe39-Lys45, que forman parte de un túnel hidrofóbico en dicho complejo. El hecho de que el dominio de unión no reconozca estrictamente a la estructura quinona como un sistema “cerradura-llave”, sugiere que existen otro tipo de interacciones que dominan a esta unión. Mutaciones individuales de Phe39Ala y Pro41Ala, han revelado la importante contribución de estos residuos para el reconocimiento del anillo quinona de la ubiquinona.⁷²

Estudios realizados con 2-metoxi-3,5,6-tricloro-1,4-benzoquinona (MQ) demostraron que en presencia de altas concentraciones de albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) su potencial de reducción se vuelve más negativo. Lo anterior, debido a que la BSA dona sus electrones a través un complejo de transferencia de carga (CT, por sus siglas en inglés) que dificulta la reducción de MQ. Elango y colaboradores, demostraron que la fuerte unión MQ-BSA en el CT ocurre a través de Trp212 donde en el BSA actúa como donador de electrones y el MQ como aceptor.⁷³

Ante este panorama, el estudio de inhibidores derivados de la 1,4-naftoquinona y de sus potenciales redox resulta de importancia para establecer la posible relación entre ambos procesos, ya que la relación entre la estructura de las proteínas, su función y la dinámica todavía no es clara en la mayoría de los casos.

71 Hasan, S.; Yamashita, E.; Baniulis, D.; Cramer, A. Quinone-dependent proton transfer pathways in the photosynthetic cytochrome *b₆f* complex. *PNAS* 110 (2013) 4297-4302.

72 Murai, M.; Matsunobu, K.; Kudo, S.; Ifuku, K.; Kawamukai, M.; Miyoshi, H. Identification of the binding site of the quinone-head group in mitochondrial Coq10 by photoaffinity labeling. *Biochem.* 53 (2014) 3995–4003.

73 Satheshkumar, A.; Elango, K. Spectroscopic and molecular docking studies on the charge transfer complex of bovine serum albumin with quinone in aqueous medium and its influence on the ligand binding property of the protein. *Spectrochimica Acta A* 130 (2014)337-343.

1.3. MODELADO Y ACOPLAMIENTO MOLECULAR

El acoplamiento molecular o docking (en inglés) es un método de modelado computacional que predice la conformación más estable de un ligante pequeño (L) cuando interacciona con una biomacromolécula. La orientación espacial que adopta L cuando forma un complejo estable se utiliza para predecir la afinidad de la interacción. El estudio de modelado molecular con el programa AutoDock, utiliza un campo de fuerza libre semi-empírico que evalúa todas las conformaciones posibles de los diferentes acoplamientos de L y la proteína (P). Éste, se parametriza mediante un gran número de complejos ligante-proteína (L-P) para los que se conocen tanto la estructura como las energías de unión. El campo de fuerza de unión se evalúa esencialmente en dos etapas, antes y después del acoplamiento L-P e involucra todas las conformaciones de L y P en ambas etapas (figura 1.12). En un primer paso, se inicia con L y P en una conformación de no unión (nu) y se estima la energía intramolecular (ϵ_i) de la transición que debe ocurrir para que ambos adquieran la orientación y conformación de unión (u) necesaria antes del acoplamiento L-P. El segundo paso, evalúa la ϵ_i de la transición de u que da como resultado el L-P.

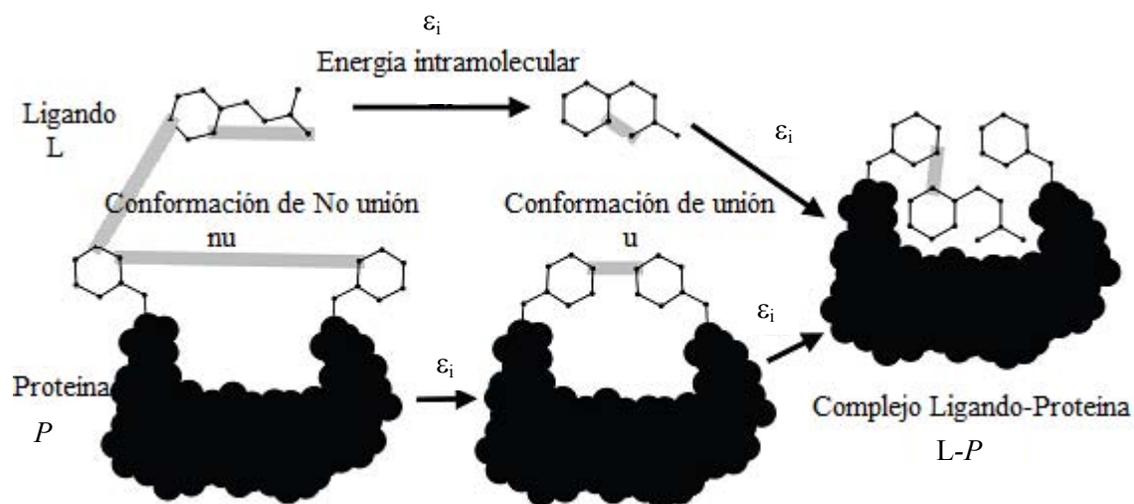


Figura 1.12. Etapas (antes y después) de evaluación del campo de fuerza de unión del acoplamiento L-P. Proteína (P) y ligante (L) en conformación de no unión (nu). Antes: evalúa la energía intramolecular (ϵ_i) de la transición estimada para adquirir la conformación necesaria antes del L-P (u). Después: evalúa la ϵ_i de la transición a u para el L-P.

Es por ello, que la estimación del campo de fuerza involucra seis pares de evaluaciones de los estados de no unión y unión (presentadas abajo como V_u o V_{nu}), así como la estimación de la pérdida de entropía tras la formación del complejo L-P (ΔS_{conf}) tal como se muestra en la ecuación 1.5.

$$\Delta G = (V_u^{L-L} - V_{nu}^{L-L}) + (V_u^{P-P} - V_{nu}^{P-P}) + (V_u^{P-L} - V_{nu}^{P-L} + \Delta S_{conf}) \quad \text{ecuación 1.5}$$

Cada uno de los seis pares de términos energéticos, incluye la evaluación de todas las fuerzas involucradas en la formación del L-P como son: las fuerzas de repulsión/dispersión de Van der Waals (W_{vdw}), la formación de puentes de hidrógeno (W_H), las fuerzas electrostáticas (W_{elec}) y la desolvatación (W_{sol}) como se muestra en la ecuación 1.6.

$$V = \underbrace{W_{vdw} \sum_{ij} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right)}_{\text{Repulsión}} + \underbrace{W_H \sum_{ij} E(\tau) \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right)}_{\text{Puentes de H}} + \underbrace{W_{elec} \sum_{ij} \left(\frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} \right)}_{\text{Electrostáticas}} + \underbrace{W_{sol} \sum_{i,j} (S_j V_j + S_i V_i) e^{-\left(\frac{r_{ij}^2}{2\sigma^2} \right)}}_{\text{Solvatación}}$$

ecuación 1.6

Para la simulación, las constantes W se han optimizado para evaluar la energía libre empírica de las interacciones basándose en un conjunto de constantes de unión determinadas experimentalmente y los demás parámetros se basan en el campo de fuerza AMBER donde:

- El término $W_{vdw} \sum_{ij} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right)$ es un típico sistema de potencial 6/12 que se refiere a las interacciones de dispersión/repulsión.
- El segundo, que es direccional $W_H \sum_{ij} E(\tau) \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right)$ se refiere a las interacciones tipo puentes de hidrógeno basándose en un potencial 10/12. Los términos C_{ij} y D_{ij} son parámetros asignados para dar una profundidad máxima de 5 Kcal/mol a 1.9 Å para enlaces de hidrógeno con oxígeno y nitrógeno, y de 1 Kcal/mol a 2.5 Å para enlaces de hidrógeno con azufre. Mientras que la función $E(\tau)$ es la que proporciona la

direccionalidad al término basada en el ángulo τ en un enlace de H con una geometría ideal.

- El término $W_{elec} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}}$ se refiere al potencial eléctrico de Coulomb seleccionado para las fuerzas electrostáticas.
- El término final $W_{sol} \sum_{i,j} (S_j V_j + S_j V_i) e^{\left(-\frac{r_{ij}^2}{2\sigma^2}\right)}$ se refiere a un potencial de desolvatación que está en función del volumen que rodea a un átomo dado ($V_{i,j}$) y que puede refugiar moléculas de disolvente. Este volumen se encuentra relacionado con un parámetro de solvatación (S_j) y un término que es exponencial con la distancia ponderada con un factor σ de 3.5Å.

Cuando se realizan estudios de acoplamiento molecular, existen principalmente dos exigencias que deben cumplirse primero: un análisis robusto y exacto, y segundo: las demandas computacionales a un nivel razonable. Un proceso ideal sería aquel que pudiera encontrar el mínimo de energía para una interacción $L-P$ explorando todos los grados de libertad del sistema en un tiempo prudente. Con el fin de satisfacer estas necesidades, el programa empleado Autodock Tools combina la evaluación de la energía basado en un sistema reticular (GRID) y la eficiente búsqueda de interacciones con libertad torsional.

Los cálculos por este método de modelado molecular involucran diversas etapas:

1. Preparación de coordenadas con AutoDockTools. En este paso, el programa utiliza un modelo que selecciona los átomos de hidrógeno polares de la macromolécula y de L pero no los unidos a átomos de carbono (no polares). Esto, con el fin de considerar solo aquellos átomos de hidrógeno que son más reactivos. Las coordenadas que se generan incluyen además cargas atómicas parciales y grados de libertad torsionales.
2. Precálculo de afinidades atómicas con AutoGrid. Se realiza una evaluación rápida de la energía precalculando el potencial de afinidad para cada tipo de átomo de L en caso de ocurrir un acoplamiento. Para esto, el sistema incorpora una red tridimensional (GRID) en la que coloca adentro un átomo de prueba para que la energía de interacción con la proteína se encuentre asignado a un punto de la cuadrícula de la rejilla. Lo anterior, con el

fin de calcular la afinidad, los potenciales electrostáticos y desolvatación de manera puntual para cada tipo de átomo de L.

3. Modelado del acoplamiento con AutoDock. Para la simulación del acoplamiento, se usa un método de búsqueda y optimización que involucra un algoritmo genético Lamarckiano empírico. Éste, se ejecuta varias veces para arrojar diversas conformaciones, así el cálculo de energía combinado con la variedad de posibles soluciones generan resultados reproducibles de acoplamientos hasta con aproximadamente 10 enlaces flexibles y por tanto, una mejor solución.

4. Análisis utilizando AutoDockTools. Aquí, se incluyen una serie de métodos para el análisis de los acoplamientos simulados incorporando la agrupación por similitud conformacional y visualización de las interacciones entre así como los potenciales de afinidad generados por AutoGrid.

CAPÍTULO 2

HIPÓTESIS

Si agentes reductores (derivados del fenol) activan al Maxicanal BK, mientras que agentes oxidantes (derivados de la 1,4-naftoquinona) lo inhiben, entonces las propiedades redox de estos compuestos podrían estar relacionadas con la modulación de este u otros canales de potasio voltaje-dependientes como el rKv1.3.

Es claro que las propiedades redox de las naftoquinonas dependen de su estructura y de los efectos electrónicos que le confieren los sustituyentes, por lo que están relacionados con la actividad biológica de éstas. Entonces, sus propiedades redox podrían funcionar como moduladoras de la actividad de canales iónicos como el rKv1.3 y/o el dShIR.

2.1. OBJETIVOS

2.1.1. *Objetivo General.*

Evaluar si existe relación entre las propiedades redox de 1,4-naftoquinona y la modulación de la actividad de los canales de potasio dependientes de voltaje rKv1.3 y dShIR.

2.1.2. *Objetivos Particulares.*

- ❖ Determinar potenciales de reducción de 1,4-naftoquinona y algunos derivados de ésta en medio hidrofóbico e hidrofílico mediante voltamperometría cíclica para obtener una medida de su poder oxidante.
- ❖ Evaluar mediante técnicas electrofisiológicas convencionales el registro de las corrientes salientes de potasio de los canales rKv1.3 y dShIR en presencia y

ausencia de los derivados de 1,4-naftoquinona previamente seleccionados con base en la mayor diferencia de su potencial de reducción.

- ❖ Evaluar el efecto de otros oxidantes y reductores sobre las corrientes de rKv1.3 que permita proponer un posible mecanismo de acción de las naftoquinonas sobre los canales rKv1.3 con base en la estructura primaria de las proteínas en estudio para proponer los posibles sitios de interacción con las naftoquinonas.
- ❖ Verificar mediante el Modelado Molecular y estudios de acoplamiento ligando-receptor (docking) los sitios y el tipo de interacción entre la naftoquinona y los canales en estudio.

2.2. ALCANCE:

Los resultados generados por esta investigación, contribuirán al uso de la electroquímica como técnica de diagnóstico en la selección de compuestos moduladores de la actividad de los canales de potasio candidatos a utilizarse en el tratamiento de algunas canalopatías.

CAPÍTULO 3

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

3.1. ESTUDIOS ELECTROQUÍMICOS (EQ)

3.1.1. Reactivos y disoluciones.

Los reactivos utilizados fueron de grado analítico de Sigma–Aldrich, USA y se emplearon sin previa purificación a menos que se especifique otra cosa. Los reactivos y sus nomenclaturas fueron: derivados de naftoquinona (NQs), 1,4-naftoquinona (NQ) (Fluka, China), 2-amino-1,4-naftoquinona (2NH₂NQ), 2-metoxi-3-metil-1,4-naftoquinona (2MeONQ), 5-hidroxi-1,4-naftoquinona (5OHNQ) y sal de potasio del 2-ácido sulfónico de 1,4-naftoquinona (2SO₃KNQ), dimetilsulfóxido (DMSO, anhidro grado HPLC, Aldrich, Reino Unido), hexafluorofosfato de tetrabutilamonio (Bu₄NPF₆) (grado electroquímico, Fluka, Suiza), cloruro de tetrabutilamonio (Bu₄NCl) (Fluka, China) y etanol (EtOH, grado absoluto 99.5% de pureza, J. T. Baker, México).

Para los experimentos EQ en medio no acuoso se utilizó como electrolito soporte una disolución 0.1 M de Bu₄NPF₆ en DMSO. Las disoluciones de NQs se prepararon disolviendo 1 mg de cada una de ellas en 1 mL de electrolito soporte obteniendo al final concentraciones de 6.3, 5.8, 5.0, 5.7 y 3.6 mM para NQ, 2NH₂NQ, 2MeONQ, 5OHNQ y 2SO₃KNQ respectivamente.

Para los experimentos EQ en medio acuoso, se prepararon disoluciones stocks de NQ, 2NH₂NQ y 5OHNQ disolviendo 5.0, 2.2 y 5.0 mg respectivamente en 1 mL de EtOH obteniendo concentraciones de 31.6, 12.7, 28.7 mM. Se adicionaron alícuotas de 3, 6 y 3 µL de estas disoluciones para obtener una concentración final cercana a 100 µM en 800 µL de ND 96 (mM: NaCl, 96; KCl, 2; CaCl₂, 1.8; MgCl₂, 1; y como amortiguador HEPES, 5; ajustando el pH a 7.0 con NaOH) como electrolito soporte.

3.1.2. Mediciones Electroquímicas.

Los estudios por VC se realizaron con un sistema convencional de tres electrodos; como electrodo auxiliar E_{aux} Pt^o, de trabajo E_T de carbón vítreo de área 7 mm² y como electrodo de referencia E_{ref} se utilizó un alambre de Ag^o previamente clorurado. El E_{ref} para los experimentos en DMSO se empleó inmerso en 3 M de Bu₄NCl en DMSO y en ND 96 en 1 M de KCl, cada uno separado de su respectivo medio con una membrana porosa de Vycor. Como electrolito soporte se utilizó una disolución de 0.1 M de Bu₄NPF₆ en DMSO con el que se obtuvo un dominio de electroactividad (DEa) de -2.3 a 1.6 V vs Bu₄NCl (3M)/AgCl/Ag^o; mientras que con ND 96 fue de -1.4 a 1.3 V vs KCl (1 M)/AgCl/Ag^o. Los valores de potencial se determinaron con referencia al sistema ferricinio/ferroceno (Fc⁺/Fc, 0.84 V en DMSO vs Bu₄NCl (3M)/AgCl/Ag^o y 0.20 V en ND 96 vs KCl (1 M)/AgCl/Ag^o de acuerdo a lo recomendado por la IUPAC⁷⁴ (Anexo 1). Previo a los ensayos electroquímicos en DMSO, la disolución de electrolito soporte se burbujeó durante 3 minutos con nitrógeno (99.99 % de pureza, INFRA, usando una trampa de humedad); después de eso, la celda se mantuvo todo el tiempo bajo atmósfera de nitrógeno.

Los voltamperogramas se obtuvieron con un potencióstato/galvanostato PAR-283 (EG&G Instruments). La adquisición de datos se realizó con el programa Power Suite v2.56 a través de una interfase GPIB-USB-HS (National Instruments). El procesamiento y corrección de los datos considerando la compensación de caída óhmica se realizó manualmente mediante la expresión $E_{\text{corregido}} = E_{\text{impuesto}} - i \cdot R_u$ con el programa Origin v6.0 (MicroCal). Se utilizó un valor aproximado de R_u de 745 Ω y 170 Ω para DMSO y ND 96 respectivamente, obtenidos con la aplicación (Determinación de la Resistencia no Compensada) que el software incluye. Todos los experimentos se realizaron dentro de una caja de Faraday BAS C2, a temperatura ambiente y partiendo desde el potencial de corriente nula (OCP, por sus siglas en inglés, Open Circuit Potential).

En los ensayos con NQ se modificó: a) la dirección del barrido de potencial, b) la concentración desde 1 hasta 10 mM y c) la velocidad de barrido de potencial catódico

74 Gritzner, G.; Küta, J. Physical and biophysical chemistry division commission on electrochemistry. *Pure Appl. Chem.* 4 (1984) 461-466.

desde 0.010 a 1 V s⁻¹. Los estudios de potencial de inversión se realizaron desde -2.4 hasta -0.4 V vs Fc⁺/Fc cada 0.05 V. Las lecturas de las corrientes de pico utilizadas para la evaluación de los parámetros voltamperométricos se obtuvieron de forma manual con el programa Origin. Los voltamperogramas se presentan en función de la corriente obtenida con respecto a la concentración (I·C⁻¹ / μA·mM⁻¹).

3.2. ESTUDIOS ELECTROFISIOLÓGICOS (EF)

3.2.1. Reactivos.

Los reactivos utilizados fueron de grado analítico de Sigma–Aldrich si no se especifica lo contrario y se utilizaron sin previa purificación. Los reactivos y sus nomenclaturas empleadas fueron: peróxido de hidrógeno (H₂O₂), glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), 2–mercaptoetanol (2SEtOH), 5,5'–ditiobis–2–ácido nitrobenzoico (DTNB) y ditionito de sodio (Ditionita, Na₂S₂O₄).

Se prepararon disoluciones madre de NQ, 2NH₂NQ y 5OHNQ disolviendo 5.0, 2.5 y 5.0mg respectivamente en 1 mL de EtOH y para los experimentos, se adicionaron alícuotas de 3, 6 y 3 μL para obtener concentraciones finales de 100 μM en 800 μL de ND 96. En casos particulares como la curva dosis respuesta, se adicionaron alícuotas variables de la disolución madre de NQ para obtener las concentraciones deseadas.

3.2.2. Expresión de los canales de potasio en ovocitos.

Los ovocitos se obtuvieron mediante ovariectomía parcial de ranas hembras *Xenopus laevis* previamente anestesiadas mediante disminución de su temperatura en un baño de hielo durante aproximadamente 40 min. Los agregados de ovocitos se separaron manualmente con micropinzas de disección de punta fina. Para su defoliculación se incubaron durante 10–20 minutos en una disolución con 1 mg/mL de colagenasa Tipo IV de *Clostridium histolyticum* (Sigma–Aldrich, Alemania) en medio OR–2 libre de Ca²⁺ (mM: NaCl, 83; KCl, 2; MgCl₂, 1 y HEPES, 5 ajustado previamente a pH 7.0 con NaOH) con agitación lenta. Finalmente, los ovocitos se lavaron e incubaron en medio ND 96 (mM: NaCl, 96; KCl, 2; CaCl₂, 1.8; MgCl₂, 1; y como amortiguador HEPES, 5; ajustando el pH a 7.0 con NaOH) fortificado con 50 mg/L de gentamicina a 18 °C.

El RNA complementario (RNAc) de rKv1.3 (número de acceso NP_062143.3, NCBI)⁷⁵ fue proporcionado por la Dra Laura Escobar, Facultad de Medicina, UNAM (DNA en colaboración con el Professor Olaf Pongs). Mientras que el RNAc de dShIR (Shaker isoforma E sin dominio de inactivación con número de acceso NP_728123.1, NCBI)^{76, 77} se transcribió *in vitro* (Anexo 2) mediante técnicas convencionales de biología molecular utilizando un kit mMessage mMachine⁷⁸ (Ambion).

Para la expresión heteróloga de las proteínas se inyectaron 50 nL de RNAc (1–2 ng) de los canales de potasio en los ovocitos empleando un microinyector (Drummond, PA). La microinyección se realizó con capilares de vidrio de borosilicato (Kwik-Fil, USA) previamente estirados y pulidos con calor. Finalmente, los ovocitos se incubaron durante 1–2 días a 18 °C en ND 96 con gentamicina para su uso posterior.

3.2.3. Registros Electrofisiológicos.

Las corrientes macroscópicas medidas a 200 Hz se registraron mediante la técnica de TEVC usando un amplificador CA1B (Dagan Corporation, USA) y una interfase (Axon, Digidata 1200, USA) acoplados a una PC. El registro de las corrientes se realizó con dos electrodos capilares que en su interior contenían una disolución 3 M KCl y un alambre de Ag^o recubierto con AgCl (figura 3.1). La resistencia de los electrodos utilizados fue de 1.0–1.5 MΩ para el de voltaje y de 0.3–0.5 MΩ para el de corriente, ambos manejados mediante micromanipuladores M3301 (World Precision Instruments, FL). Los ovocitos se mantuvieron en una celda de 800 μL con medio ND 96 y se insertaron los capilares con la ayuda de un microscopio estereoscopio (Leica GZ6). Para los registros, se emplearon sólo ovocitos que presentaron un nivel de expresión heteróloga adecuada fijado en este trabajo con un valor de corriente iónica mayor a 3 μA. La adquisición y análisis de datos se realizó mediante el software pClamp versión 8.0 (Axon Instruments) y Origin 6.0 respectivamente.

75 Stühmer, W.; Ruppersberg, J.; Schröter, K.; Sakmann, B.; Stocker, M.; Giese, K.; Perschke, A.; Baumann, A.; Pongs, O. Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian. *EMBO J.* 8 (1989) 3235-44.

76 Hoshi, T.; Zagotta, W.; Aldrich, W.; Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* 250 (1990) 533-538.

77 Zagotta, W.; Hoshi, T.; Aldrich, W. Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science* 250 (1990) 568-571.

78 Shih, T.; Smith, R.; Toro, L.; Goldin, A. High-level expression and detection of ion channels in *Xenopus* oocytes. *Meth. in Enzymol.* 293 (1998) 529–556.

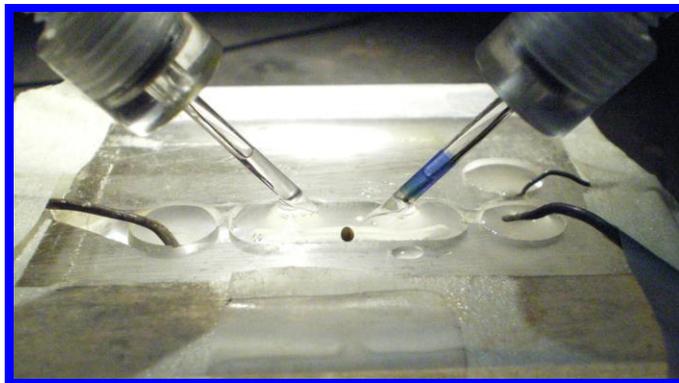


Figura 3.1. Sistema de TEVC para el monitoreo de las corrientes macroscópicas de potasio de los canales en estudio. El sistema está compuesto por dos electrodos de KCl (1 M)/AgCl/Ag^o (capilares) y tres NaCl (96 mM)/AgCl/Ag^o (externos). Volumen de celda 800 μ L.

Para el trazo de las curvas de corriente en función del tiempo $I=f(t)$ se inició en todos los casos, desde un potencial de mantenimiento -60 mV ideal para la célula. Se aplicó un protocolo de siete pulsos desde -60 mV hasta $+60$ mV con intervalos de $+20$ mV durante 130 y 180 ms para rKv1.3 y dShIR respectivamente. Para la medición de las corrientes generadas por la salida de potasio (I_K) en presencia de NQ (I_{NQ}) sólo se consideró el pulso a $+60$ mV. Para la evaluación del curso temporal de las corrientes transitorias se aplicó un tren de pulsos desde -60 mV hasta $+60$ mV durante 80 ms cada 330 ms.

La alteración de las corrientes de potasio en presencia de los compuestos ensayados se evaluó al final del pulso debido a que ahí permanecían constantes aún después de 5 minutos de la aplicación. Para evaluar la reversibilidad del efecto, se removieron de la celda los compuestos probados mediante perfusión manual realizando diversos lavados de 1 mL (cambiando casi 10 veces el total del volumen de la capacidad de la celda) para eliminar totalmente a los compuestos del baño. El porcentaje de inhibición $I_K(\text{canal})\%$ se determinó como $\{(I_{\text{control}} - I_{\text{NQ}}) / I_{\text{control}}\} * 100$ para los compuestos en estudio. Los valores se presentan en todos los casos como la media \pm desviación estándar y para considerar un efecto estadísticamente significativo se evaluaron los datos mediante la herramienta de t-student con una confiabilidad del 95 %, $p=0.05$ (Anexo 2). Para una mejor presentación, facilidad de análisis y discusión con base en la comparación de secuencias primarias que se muestran en el capítulo 5, se hace uso de la nomenclatura abreviada de aa en una sola letra (Véanse abreviaturas).

3.3. ESTUDIOS DE MODELADO MOLECULAR Y DE ACOMPLAMIENTO

3.3.1. Construcción de los modelos 3D de las proteínas (receptores).

Para la construcción de los modelos 3D de los canales rKv1.3 y dShIR se utilizaron las secuencias de aa de los mismos RNAc empleados en los estudios EF con base en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Se emplearon las secuencias de rKv1.3 y dShIR previamente publicadas por Pongs⁷⁵ (1989) con número de acceso NP_062143.3 y por Aldrich^{76,77} (1990) con número de acceso NP_728123.1 respectivamente. Adicionalmente, se construyó el modelo 3D del canal Kv1.3 proveniente de humano, hKv1.3, utilizando la secuencia publicada por Grissmer⁷⁹ (1992) con número de acceso NP_002223.3.

Las secuencias en estudio se alinearon en SDSC–Biology WorkBench (<http://workbench.sdsc.edu>) y se verificó su identidad entre ellas con la herramienta en línea ClustalW (Multiple Sequence Alignment, versión 3.2) manteniendo todos los parámetros originales y todas estas se compararon (Anexo 3). Posteriormente, se sometieron a un BLAST en línea (Basic Local Alignment Search, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) en un intento de encontrar un molde (template) para la construcción de los monómeros, realizándose de manera automática con los programas en línea i-Tasser y Swiss Model.⁸⁰ Finalmente, con los monómeros se construyeron los homotetrámeros utilizando el programa en línea SymmDock⁸¹ manteniendo todos los parámetros originales.

79 Grissmer, S.; Ghanshani, S.; Dethlefs, B.; McPherson, J.; Wasmuth, J.; Gutman, G.; Cahalan, M.; Chandy, K. The Shaw-related potassium-channel gene, Kv3.1, on human chromosome 11, Encodes the type I K⁺ channel in T cells. *Journal of Biological Chemistry* 267 (1992):20971-20979.

80 a) Arnold, K.; Bordoli, L.; Kopp, J.; Schwede, T. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22 (2006) 195-201.

b) Schwede, T.; Kopp, J.; Guex, N.; Peitsch, M. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research* 31 (2003) 3381-3385.

c) Guex, N.; Peitsch, M. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* 18 (1997) 2714-2723.

81 a) Schneidman-Duhovny, D.; Inbar, Y.; Nussinov, R.; Wolfson, H. PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. *NAR* 33 (2005) W363-W367.

b) Schneidman-Duhovny, D.; Inbar, Y.; Nussinov, R.; Wolfson, H. Geometry based flexible and symmetric protein docking. *Proteins* 60 (2005) 224-231.

3.3.2. Refinamiento de ligantes.

Como L se utilizaron: NQ, 5OHNQ y 2NH₂NQ. Sus geometrías estructurales fueron optimizadas mediante el método de Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) empleando el programa Gaussian 5.0 con un nivel de base B3LYP/631G.

3.3.3. Reconocimiento ligante–receptor.

A todas las estructuras de *P* se les adicionaron (con el programa AutoDock) únicamente los hidrógenos polares manteniendo los otros parámetros fijos. Para el reconocimiento L–*P*, se utilizó un máximo de 10⁷ evaluaciones empleando un algoritmo genético Lamarckiano. Para delimitar espacialmente los posibles sitios de interacción se generó un GRID (reticulado) de 126 x 126 x 126 Å, de tal forma que este espacio abarcara sitios extracelulares e intracelulares de *P*. En el caso de los monómeros se utilizó una resolución de espaciado de 0.375 Å mientras que para los tetrámeros fue de 0.769 Å. Cabe mencionar que en la simulación se incluyeron aquellos sitios de *P* que *in vivo* aparentemente serían inaccesibles por la presencia de la bicapa lipídica de las membranas. Para el análisis de datos, únicamente se tomaron en cuenta las 100 mejores evaluaciones de energía que a su vez, fueron agrupadas considerando un valor de desviación estándar de 0.5 Å. Para el análisis final se consideró la energía libre, el número y tipo de interacciones de cada complejo. Las visualizaciones del docking se realizaron con el programa VMD (Visual Molecular Dynamics).

3.3.4. Comparación *in vivo* vs *in silico*.

Se empleo como parámetro de comparación la energía libre calculada por AutoDock Tools para la evaluación de la afinidad de L–*P* y únicamente se consideraron aquellos complejos que presentaron los valores más negativos. Finalmente, los resultados del modelado molecular se compararon con los datos experimentales obtenidos mediante las técnicas EQ y EF.

CAPÍTULO 4

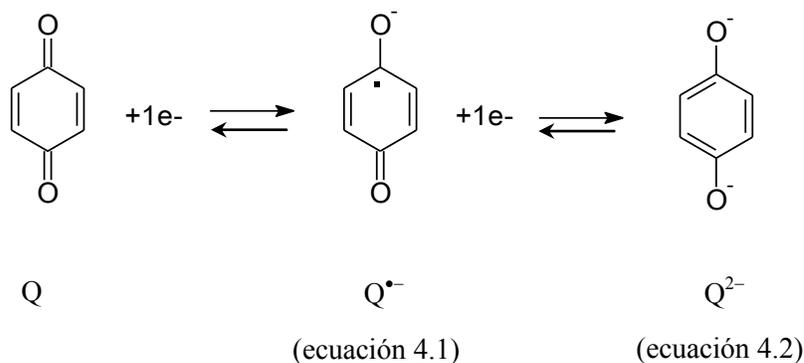
ESTUDIOS ELECTROQUÍMICOS (EQ)

En vías de aportar información acerca de la posible modulación de la actividad de los canales de interés en función del potencial redox de NQ, se llevaron a cabo estudios electroquímicos por VC. En un intento de simular los ambientes a los que se enfrentan las especies dentro de las células, se analizó la posible relación entre sus propiedades electrónicas en medios acuoso y no acuoso. El uso de la VC en este trabajo, tiene como principal objetivo evaluar si la inhibición de rKv1.3 en presencia de NQ sólo se debe a un proceso de naturaleza redox, o bien encontrar evidencia de que también puede haber efectos importantes que le confiere la estructura química de la NQ. Para ello, se determinaron los potenciales de reducción de algunos derivados de NQ (NQs) conservando el núcleo NQ pero con diferentes sustituyentes. De acuerdo con los diferentes entornos a los que se puede enfrentar la NQ cuando interacciona con los canales iónicos, los experimentos por VC se realizaron en DMSO y en ND 96 (como simulación de medio hidrofóbico e hidrofílico respectivamente). Los estudios resultan de gran importancia ya que el potencial redox asociado a las especies involucradas podría ser un indicativo de la energía asociada al proceso de interacción (acoplamiento) de estas especies, con los canales iónicos.

Diversos autores han comprobado que la actividad de las quinonas (Q) está relacionada con su capacidad de aceptar uno o dos electrones^{50,82,83} (potencial redox) para formar el correspondiente radical anión, $Q^{\cdot-}$ (ecuación 4.1) o dianión, Q^{2-} (ecuación 4.1). Se ha verificado que el potencial redox de Q, depende también de la estabilidad de sus especies reducidas y que se encuentra relacionado directamente con su estructura química. Por lo tanto, éste puede ser modificado por la presencia de sustituyentes en el anillo y por los efectos electrónicos que le confiere el entorno (disolvente).

82 Solorio-Alvarado, C.; Peña-Cabrera, E.; García-Soto, J.; López-Godínez, J.; González, F.; Álvarez-Hernández, A. 2-Hydroxynaphthoquinones. Synthesis, electrochemical study, and biological assays of activity. *ARKIVOC* (2009) 239–257

83 Wang, L.; Zhang, Z.; Ye, B. Study on the electrochemical behaviour of the anticancer herbal drug emodin. *Electrochimica Acta* 51 (2006) 5961–5965.



Se ha demostrado que en medios apróticos como DMSO, ACN o DMF, es poco probable que ocurran reacciones colaterales durante el proceso de reducción de Q. Sin embargo, en medios próticos, el disolvente participa como donador de protones.^{84,85,86} Para el sistema Q, los efectos electroattractores o electrodonadores afectan sus propiedades redox^{87,88,89} y en algunos casos, se ha informado que modifican su actividad biológica.^{90,91} Entonces, la polaridad del disolvente, la naturaleza del electrolito soporte, las posibles interacciones intra o intermoleculares, la presencia de aditivos ácidos o básicos, asociaciones iónicas y equilibrios de protonación y/o desprotonación, juegan un papel crucial en la estabilidad de las especies reducidas de las quinonas por lo que se intentarán abarcar algunos de ellos en los ensayos electroquímicos.

-
- 84 Gupta, N.; Linschitz, H. Hydrogen-bonding and protonation effects in electrochemistry of quinones in aprotic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 6384–6391.
- 85 Pletcher, D.; Thompson, H. A microelectrode study of the influence of electrolyte on the reduction of quinones in aprotic solvents. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 94 (1998) 3445–3450.
- 86 Bautista-Martínez, J.; González, I.; Aguilar-Martínez, M. Correlation of voltammetric behavior of α -hydroxy and α -methoxy quinones with the change of acidity level in acetonitrile. *J. Electroanal. Chem.* 573 (2004) 289–298
- 87 Aguilar-Martínez, M.; Macías-Ruvalcaba, N.; Bautista-Martínez, J.; Gómez, M.; González, F.; González, I. Review: Hydrogen bond and protonation as modifying factors of the quinone reactivity. *Current. Org. Chem.* 8 (2004) 1721–1738.
- 88 Aguilar-Martínez, M.; Bautista-Martínez, J.; Macías-Ruvalcaba, N.; González, I.; Tovar, E.; Marín del Alizal, T.; Collera, O.; Cuevas, G. Molecular structure of substituted phenylamine α -OMe- and α -OH-p-benzoquinone derivatives. *J. Org. Chem.* 66 (2001) 8349–8363.
- 89 Gómez, M.; González, F.; González, I. Intra and intermolecular hydrogen bonding effects in the electrochemical reduction of α -phenolic-naphthoquinones. *J. Electroanal. Chem.* 578 (2005) 193–202.
- 90 Inbaraj, J.; Chignell, C. Cytotoxic action of juglone and plumbagin: A mechanistic study using HaCaT keratinocytes. *Chem. Res. Toxicol.* 17 (2004) 55–62.
- 91 Hernández-Muñoz, L.; Gómez, M.; González, F.; González, I.; Frontana, C. Towards a molecular-level understanding of the reactivity differences for radical anions of juglone and plumbagin: an electrochemical and spectroelectrochemical approach. *Org. Biomol. Chem.* 7 (2009) 1896–1903.

4.1. DISCUSIÓN DE RESULTADOS ELECTROQUÍMICOS

4.1.1. Caracterización de NQ en medio aprótico (DMSO).

Se obtuvieron los voltamperogramas a 0.1 V/s en dirección catódica y anódica de una disolución 6.3 mM de NQ en 1 mL de 0.1 M de Bu₄NPF₆ en DMSO como electrolito soporte. Los trazos se realizaron partiendo del OCP y en el intervalo de potencial establecido por el dominio de electroactividad. En la figura 4.1, se muestra el voltamperograma típico de la reducción de NQ sobre un electrodo de carbón en DMSO. Se observan dos señales características de reducción (Ic y IIc) y dos de oxidación (Ia y IIa) que sugieren una transferencia monoeléctrica tal como se encuentra descrito en la literatura.⁹² La primera transferencia (Ic) corresponde a la reducción de NQ a un radical anión o seminaftoquinona, NQ^{•-}, mientras que la segunda (IIc) está asociada a la reducción de la seminaftoquinona a una especie dianión, NQ²⁻, (ecuación 4.3 y 4.4 respectivamente). Ambos procesos son reversibles en la escala de tiempo de los experimentos. Se verificó la correspondencia entre las señales de reducción (catódicas) y oxidación (anódicas) Ic–Ia y IIc–IIa (figura 4.1, líneas discontinuas) mediante estudios de potenciales de inversión catódicos (E_{-λ}).



A partir de voltamperogramas obtenidos a diferentes velocidades de barrido de potencial (ν de 0.010 a 1 V s⁻¹) se analizaron los valores de las corrientes de pico $|i_p|$ de las señales anódicas (i_{pa}^I , i_{pa}^{II}) y catódicas (i_{pc}^I , i_{pc}^{II}) en función de $\nu^{1/2}$ (figura 4.2 panel A). La tendencia lineal de estas corrientes (para valores véase tabla A1.2 en Anexo 1) sugieren procesos electroquímicos controlados por la difusión según la ecuación de Randles–Sevcik ($i_p = Cte \cdot n^{3/2} A_e C D^{1/2} \nu^{1/2}$). La relación constante de los potenciales de pico E_p en función de ν (figura 4.2 panel B) junto con la diferencia de E_p , ($|\Delta E_p| = E_{pa} - E_{pc}$) cercana a 60 mV para sistemas que intercambian un electrón, sugieren prácticamente el comportamiento típico de

92 D. B. Raoof, S. M. Golabi, Electrochemical properties of carbon-paste electrodes spiked with some 1,4-naphthoquinone derivatives. Bull. Chem. Soc. Jpn. 68 (1995) 2253–2261.

un sistema reversible. El hecho de que la correlación $|i_{pa}/i_{pc}|$ sea cercana a uno (figura 4.2 panel C) propone además que la reducción de NQ, en la escala de tiempo de los experimentos, genera los productos estables de la reacción electroquímica $NQ^{\bullet-}$ y NQ^{2-} . Sin embargo, la correspondencia lineal de $|i_p/v^{1/2}|$ en función de v con pendiente diferente de cero (figura 4.2 panel D) sugiere un proceso con ligeras complicaciones cinéticas al electrodo y/o la presencia de reacciones químicas acopladas a la transferencia electrónica; por ejemplo por impurezas o humedad del disolvente. Algunos autores han demostrado que debido a su naturaleza como aceptor de hidrógenos, el DMSO puede solvatar a las especies de NQ que se generan durante su reducción. A su vez, se ha verificado que al poseer la seminaftoquinona un tiempo de vida corto, puede someterse fácilmente a reacciones de desproporción (DISP) como la expresada en la ecuación 4.5 generando naftoquinona y su correspondiente dianión.

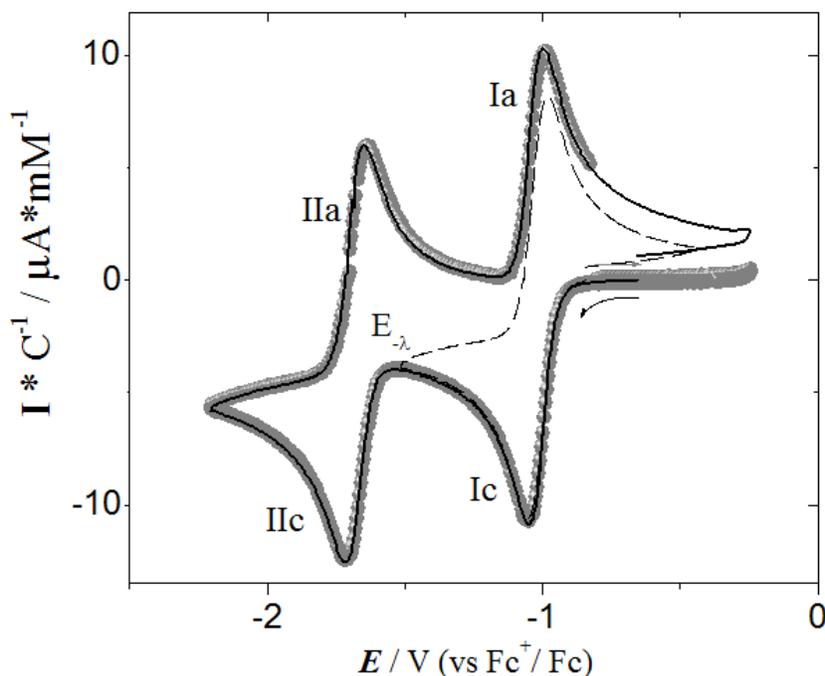


Figura 4.1. Voltamperograma típico de 6.3 mM de NQ en 0.1 M $Bu_4NPF_6/DMSO$ en dirección catódica (–), anódica (*) y $E_{\lambda} = -1.5$ V (–) comenzando desde OCP. Velocidad de barrido de potencial de 0.1 V/s, E_T carbón vítreo (ϕ 7.1 mm²), E_{aux} Pt^o y E_{ref} electrodo de Bu_4NCl (3M)/AgCl/Ag^o en DMSO.

Los parámetros analizados confirman un sistema reversible de transferencia monoeléctrica rápida con ligeras complicaciones cinéticas y controlado por la difusión tal como está descrito en la literatura.^{93,94,95,96,97} Con base en los experimentos a diferentes valores de ν , se determinaron los valores de potencial de media onda ($E_{1/2}$) de -1.024 y -1.699 V (vs Fc^+/Fc) para la señal Ic–Ia (ecuación 4.3) y IIc–IIa (ecuación 4.4) respectivamente a partir de la ecuación 4.6.

$$E_{1/2} = (E_{\text{pa}} + E_{\text{pc}}) / 2 \quad (\text{ecuación 4.6})$$

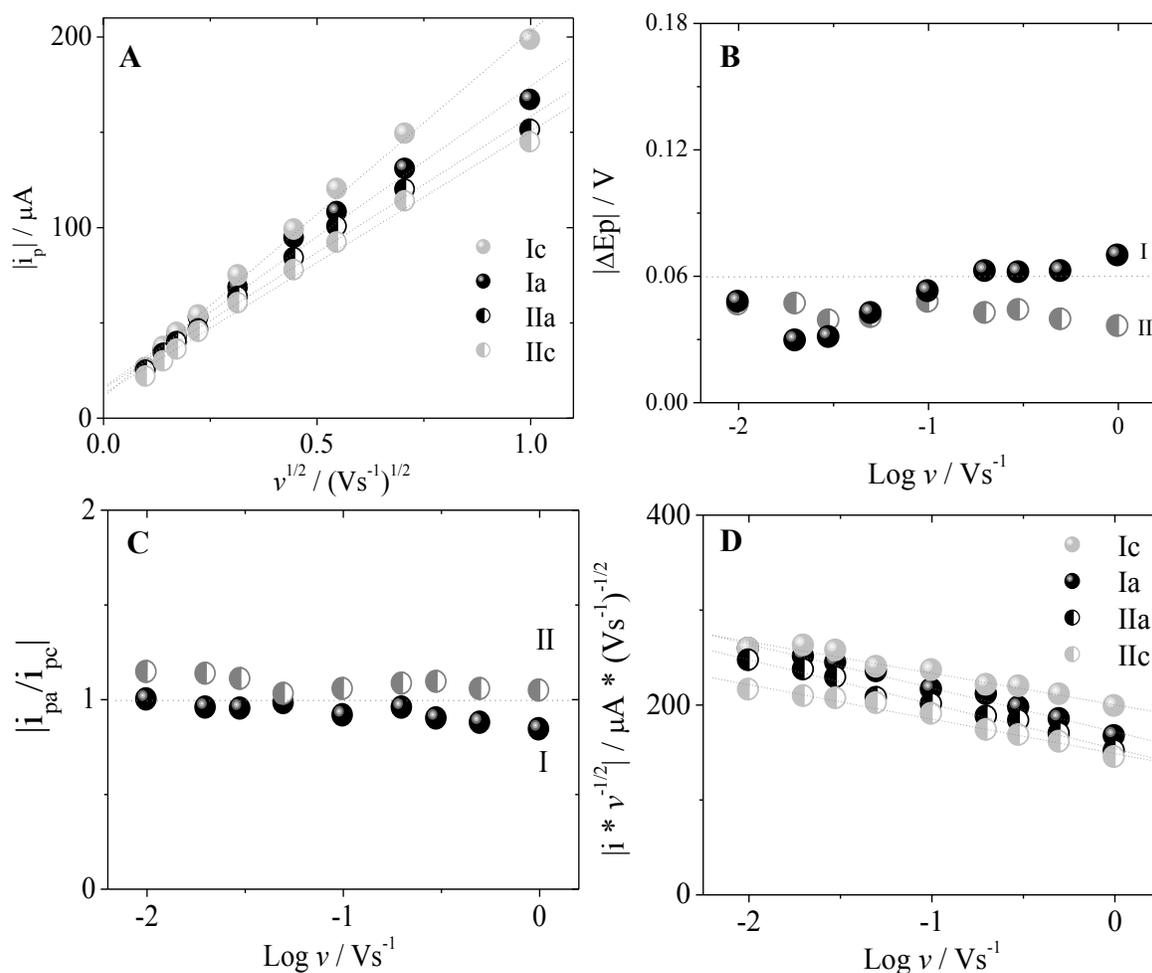


Figura 4.2 Análisis de: A) $|i_p|$ en función de $\nu^{1/2}$, B) $|\Delta E_p|$, C) $|i_{\text{pa}}/i_{\text{pc}}|$ y D) $|i_p/\nu^{1/2}|$ en función de $\text{Log } \nu$.

93 G. Mabbott, An introduction to cyclic voltammetry. Journal of Chemical Education 60 (1983) 697-701.

94 J. M Pingarrón, P. Sanchez, Química Electroanalítica (1999) Ed. Síntesis, España.

95 J. Bard, L. R. Faulkner, Electrochemical methods, fundamental and application (1980) John Wiley & Sons, New York.

96 C. Frontana, B.A. Frontana-Urbe, I. González, Electrochemical study of 7 α ,12,20-o-trimethylconacytone. Electrochimica Acta 48 (2003) 3593-3598.

97 P. Guin, S. Das, P. Mandal, Electrochemical reduction of quinones in different media: A review. Int. J. Electrochem. (2011).

De la misma forma y bajo las mismas condiciones experimentales, se obtuvieron los voltamperogramas de 2NH₂NQ, 2MeONQ, 5OHNQ y 2SO₃KNQ definiéndolos en este trabajo como derivados de NQ (NQs). Los resultados y el cálculo de sus potenciales de reducción se describen a continuación.

4.1.2. Caracterización de NQ's en medio aprótico.

Diversos autores se han dado a la tarea de demostrar que la reactividad de las quinonas predominantemente está relacionada con los productos intermediarios y/o finales de su reducción. Éstos se encuentran íntimamente afectados por: la presencia de grupos electrodonadores y/o electroattractores, la basicidad y/o nucleofilicidad de sus sustituyentes y en algunos casos, por el establecimiento de puentes de hidrógeno intramoleculares. Es por ello, que la discusión electroquímica de los NQs utilizados en este estudio, se presenta a continuación centrándola en alguna(s) de estas propiedades químicas.

Los voltamperogramas de los NQs en dirección catódica y anódica, presentaron características similares a NQ: dos señales de reducción I_c y II_c, y dos de oxidación I_a y II_a (ecuación 4.3 y 4.4). Todas las señales obtenidas en el intervalo de potencial de -0.75 a -2.25 V vs Fc⁺/Fc (figura 4.3) son reversibles química y electroquímicamente. La correspondencia entre I_c-I_a y II_c-II_a de los NQs se verificó mediante estudios de E_λ (figura 4.4, líneas discontinuas). De manera general, la transferencia electrónica que ocurre en I y II en todos los casos está controlada por la difusión (véase tabla A1.2 en Anexo 1) y el análisis de $|i_p/v^{1/2}|$ en función de v sugiere la presencia de reacciones acopladas y/o ligeras complicaciones cinéticas tal como se observó con NQ (figura 4.5). En algunos casos, se observó además la presencia de señales a potenciales más positivos de -0.75 V denotadas como III, IV, V y VI (figura 4.4). Estas señales se intentarán analizar de manera simple, ya que no es objetivo de este trabajo el elucidar formalmente los mecanismos de óxido-reducción de las especies en estudio.

Se determinaron los valores de potencial de media onda (señales I y II) mediante la ecuación 4.6 y los resultados se muestran en la Tabla 4.1.

Compuesto	DMSO	
	$E_{1/2}^I$ (V)	$E_{1/2}^{II}$ (V)
2NH ₂ NQ	-1.296	-1.955
2MeONQ	-1.130	-1.896
NQ	-1.024	-1.699
2SO ₃ KNQ	-1.017	-1.634
5OHNQ	-0.842	-1.453

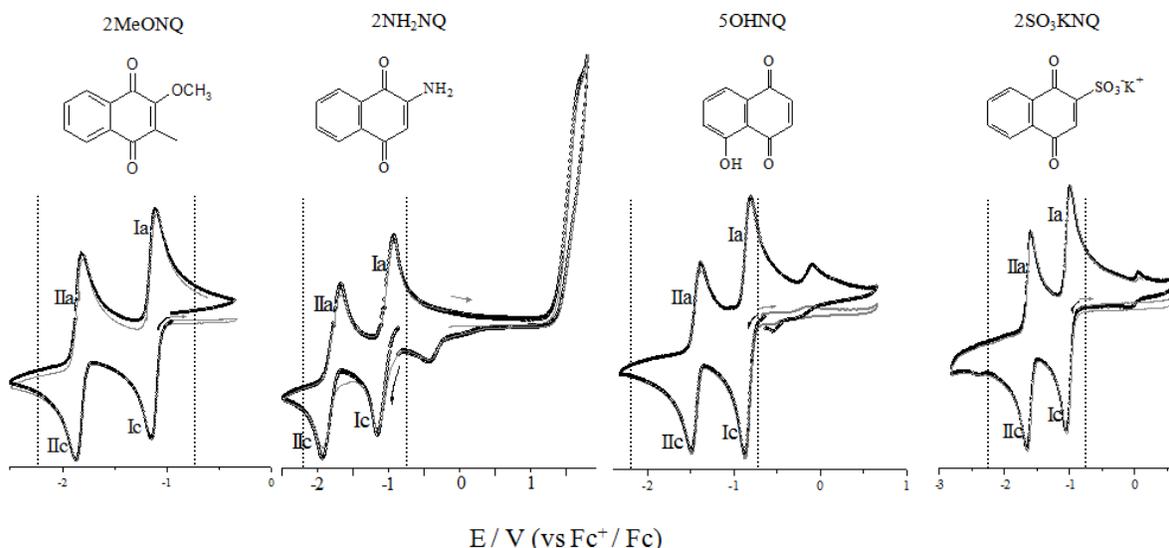
Tabla 4.1: Potenciales $E_{1/2}$ de NQs obtenidos en DMSO/V (vs Fc⁺/Fc).

Figura 4.3. Comparación de voltamperogramas de NQs en 0.1 M Bu₄NPF₆/DMSO en dirección catódica (negro) y anódica (gris) a una velocidad de barrido de potencial de 0.1 V/s desde OCP. E_T carbón vítreo (φ 7.1 mm²), E_{aux} Pt° y E_{ref} electrodo de Bu₄NCl (3M)/AgCl/Ag° en DMSO.

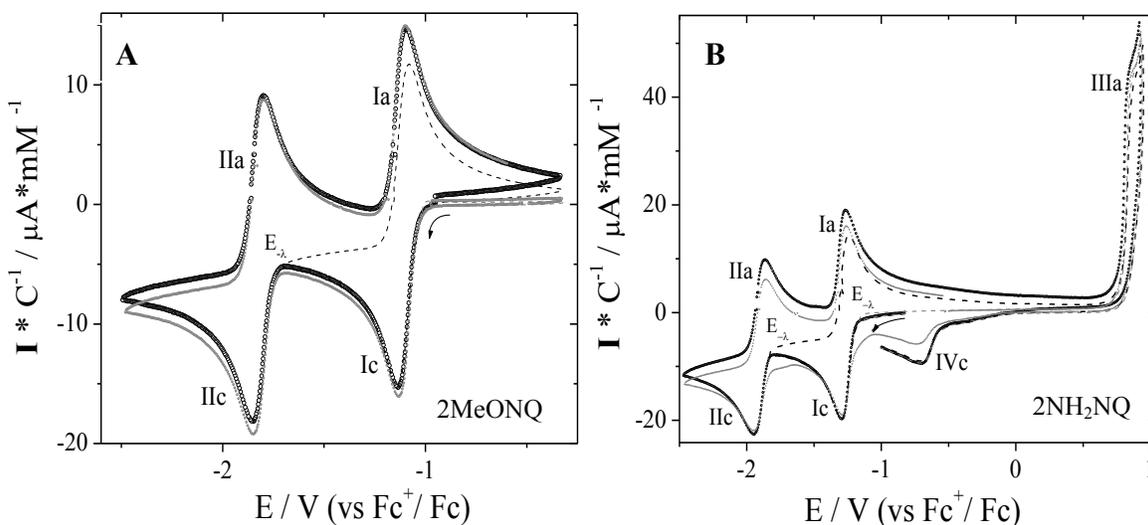


Figura 4.4. Voltamperogramas de A) 5 mM de 2MeONQ, B) 5.8 mM de 2NH₂NQ, C) 5.7 mM de 5OHNQ y D) 3.6 mM de 2SO₃KNQ en 0.1 M Bu₄NPF₆/DMSO como electrolito soporte, en dirección catódica (○) y anódica (◐). Estudios de potenciales de inversión catódico E_{-λ} (---). Trazos obtenidos a 0.1 V/s comenzando desde OCP, E_T carbón vítreo (φ 7.1 mm²), E_A Pt° y E_R electrodo de Bu₄NCl (3M)/AgCl/Ag° en DMSO.

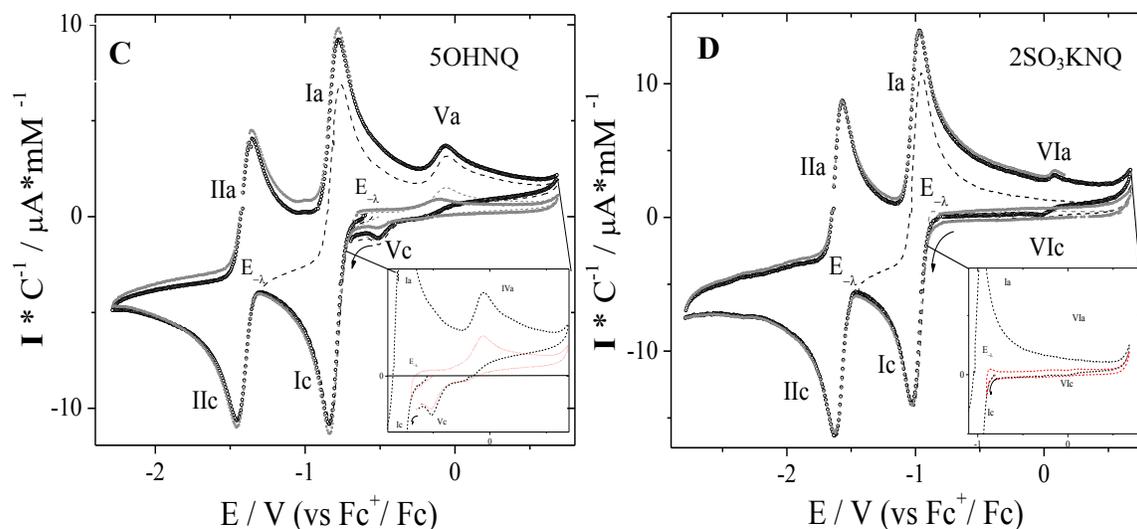


Figura 4.4 (continuación). Voltamperogramas de A) 5 mM de 2MeONQ, B) 5.8 mM de 2NH₂NQ, C) 5.7 mM de 5OHNQ y D) 3.6 mM de 2SO₃KNQ en 0.1 M Bu₄NPF₆/DMSO como electrolito soporte, en dirección catódica (○) y anódica (◐). Estudios de potenciales de inversión catódico $E_{-λ}$ (---). Trazos obtenidos a 0.1 V/s comenzando desde OCP, E_T carbón vítreo (ϕ 7.1 mm²), E_A Pt⁰ y E_R electrodo de Bu₄NCl (3M)/AgCl/Ag⁰ en DMSO.

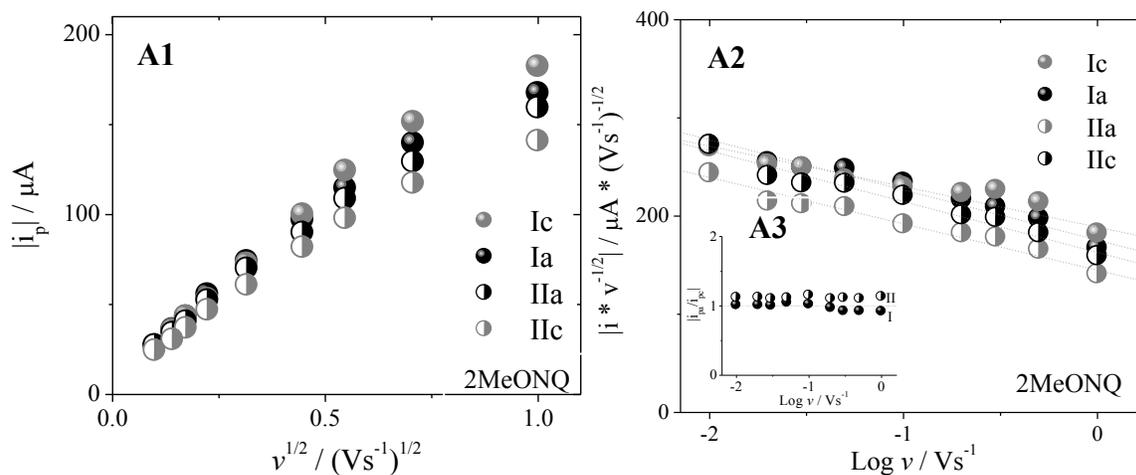


Figura 4.5 Análisis de: 1) $|i_p|$ en función de $v^{1/2}$, 2) $|i_p/v^{1/2}|$ en función de $\text{Log } v$, 3) inserto $|i_{pa}/i_{pc}|$ en función de $\text{Log } v$ de: A) 2MeONQ, B) 2NH₂NQ, C) 5OHNQ y D) 2SO₃KNQ. Datos obtenidos a partir voltamperogramas adquiridos a diferente v .

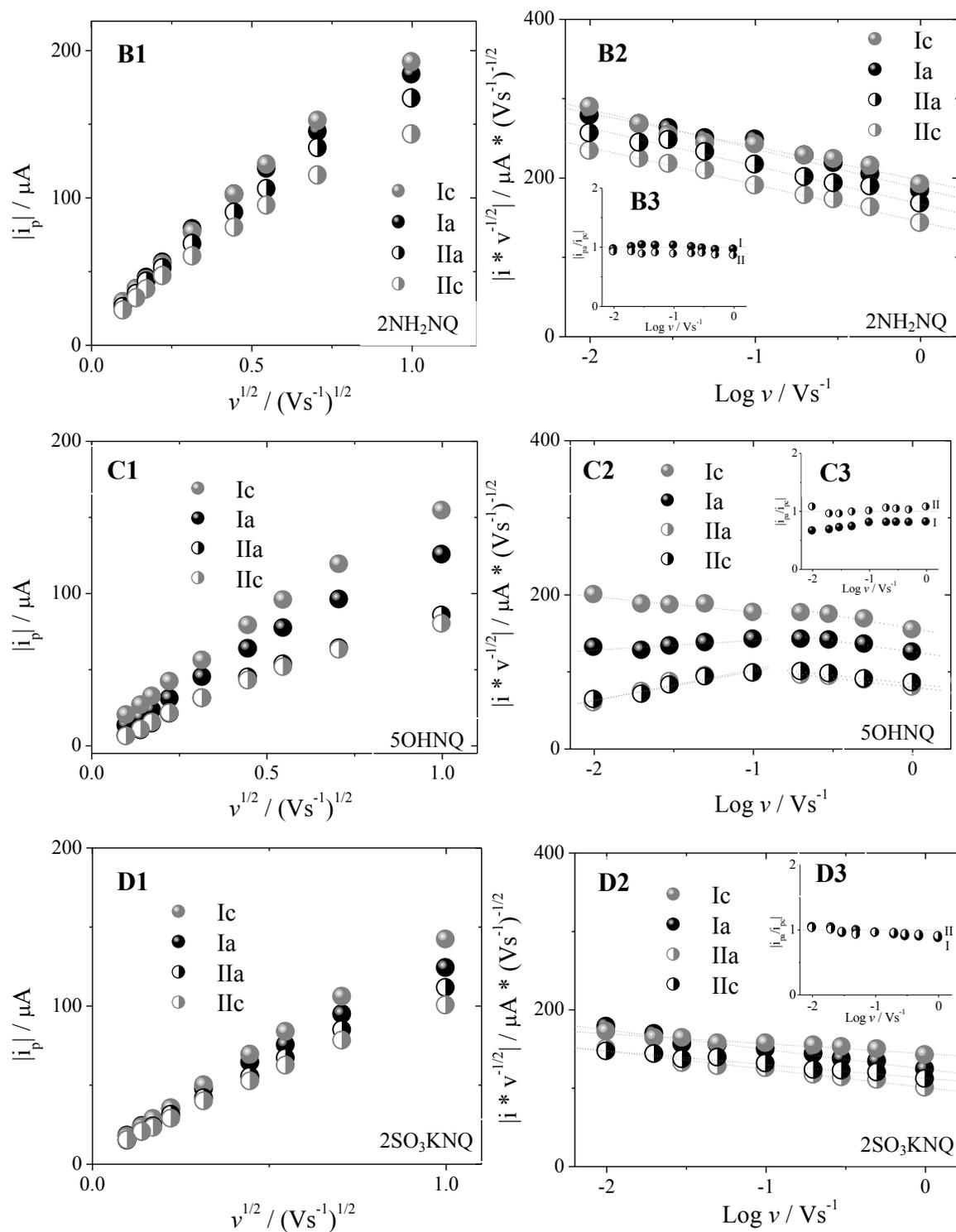


Figura 4.5 (continuación) Análisis de: 1) $|i_p|$ en función de $v^{1/2}$, 2) $|i_p|/v^{1/2}$ en función de $\text{Log } v$, 3) inserto $|i_{pa}/i_{pc}|$ en función de $\text{Log } v$ de: A) 2MeONQ, B) 2NH₂NQ, C) 5OHNQ y D) 2SO₃KNQ. Datos obtenidos a partir voltamperogramas adquiridos a diferente v .

En los voltamperogramas de 2MeONQ (figura 4.4, panel A) no se observan señales adicionales a I y II en el intervalo de potencial establecido por el electrolito soporte. El efecto inductivo de los grupos –OMe y –Me en la posición 2 y 3 de NQ, así como sus propiedades electrodonadoras principalmente del –OMe, dificultan la entrada de un electrón para la reducción de la quinona. Como consecuencia de éstos, los potenciales de las señales I y II se desplazan a valores catódicos con respecto a los determinados para NQ.

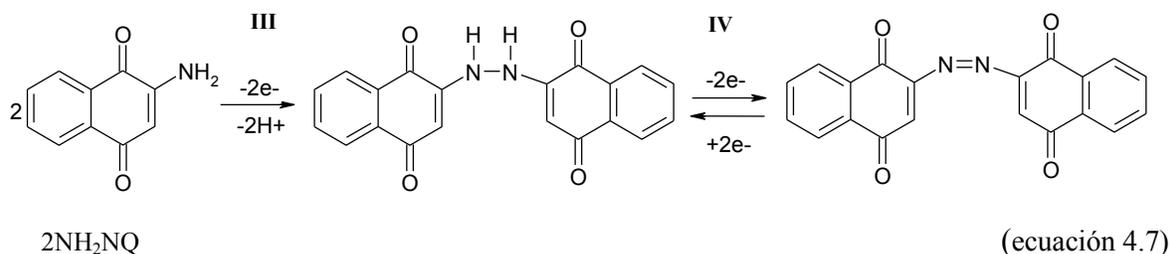
Se ha informado que polímeros conductores que contienen 2NH₂NQ, pueden oxidarse y liberar dos protones para formar un azoproducto mediante un mecanismo ECCE (ecuación 4.7).⁹⁸ Este tipo de mecanismo y producto final, se han observado también con otras aminas aromáticas.^{99,100,101} En el caso de 2NH₂NQ (figura 4.4, panel B) se obtuvo una señal de oxidación adicional denotada como IIIa y una de reducción IVc. Los voltamperogramas adquiridos en dirección anódica sugieren que la(s) especie(s) electroactiva(s) en el intervalo de potencial de -1 a 1 V vs Fc⁺/Fc se generan al electrodo por la oxidación del grupo amino que ocurre prácticamente sobre la barrera anódica, IIIa (ecuación 4.7). Mientras que la reducción del posible azoproducto generado, IVc, ocurre a potenciales menos positivos. La hipótesis de que ocurran estas reacciones acopladas al sistema electroquímico justifica la disminución de las corrientes Ic y IIc en los voltamperogramas al iniciar con un barrido anódico (figura 4.4, panel B); ya que hay menor cantidad de 2NH₂NQ libre y disponible al electrodo. Finalmente, el desplazamiento de los potenciales de I y II hacia valores más catódicos en comparación con NQ, se atribuye principalmente a la basicidad del grupo –NH₂ siendo más importante que su efecto inductivo y electrodonador.

98 M. Pham; B. Piro; E. Bazzouji; M. Hedayatullah; J. Lacroix; P. Novák; O., Haas. Anodic oxidation of 5-amino-1,4-naphthoquinone (ANQ) and synthesis of a conducting polymer (PANQ). *Synthetic Metals* 92 (1998) 197-205.

99 H. Lund; O. Hammerich. *Organic Electrochemistry* (2001). Marcel Dekker, Inc., Basel New York.

100 G. Mabbott. An introduction to cyclic voltammetry. *J. Chem. Edu.* 60 (1983) 697-701.

101 P. Kissinger; W. Heineman. Cyclic voltammetry. *J. Chem. Edu.* 60 (1983) 702-706.



En los voltamperogramas de 5OHNQ (figura 4.4, panel C) se observaron dos señales adicionales, una de oxidación Va y una de reducción Vc. Los estudios de $E_{-λ}$ justo al comienzo de Ic (zoom en figura 4.4, panel C) sugieren que Va está asociada con la oxidación de especies generadas a partir de la reducción de 5OHNQ que ocurre en Ic. La presencia de grupo-OH en posición β al carbonilo no modifica la reversibilidad de I y II ya que no es lo suficientemente ácido para autoprotónar a las especies semiquinona y/o dianión.^{102,103,104} Se ha descrito que el mecanismo de reducción de 5OHNQ es más complejo que el de otras quinonas sustituidas y no puede dilucidarse únicamente con las ecuaciones 4.8 y 4.9 (análogas de 4.3 y 4.4). Para explicar las señales observadas en los voltamperogramas, algunos autores han propuesto considerar otras reacciones químicas y electroquímicas (ecuaciones 4.10–4.16).^{105,106,107,108} Cuando ocurre la primera transferencia electrónica de la hidroxinaftoquinona, OHNQ (ecuación 4.8) se produce la hidroxinaftosemiquinona $\text{OHNQ}^{\cdot-}$ que en presencia de OHNQ, genera un complejo hidroxinaftosemiquinona–hidroxinaftoquinona neutra $(\text{OHNQ})_2^{\cdot-}$ (ecuación 4.10) soportado vía puentes de hidrógeno e interacciones tipo π . La formación de $(\text{OHNQ})_2^{\cdot-}$ se observa particularmente en DMSO debido a la capacidad de solvatación del disolvente, a su naturaleza como aceptor de protones y como consecuencia, a la competencia de éste por los

102 F. González, Cyclic voltammetry of two analogue K-group vitamin compounds in dimethylsulfoxide. *Electroanalysis*. 10 (1998) 638–642.

103 M. Gómez, F. González, I. González. Intra and intermolecular hydrogen bonding effects in the electrochemical reduction of α -phenolic-naphthoquinones. *J. Electroanal. Chem.* 578 (2005) 193-202.

104 C. Frontana, I. Gonzalez. The role of intramolecular Hydrogen Bonding in the Electrochemical Behaviour of Hydroxy-Quinones and in Semiquinones Stability. *J. Braz. Chem. Soc.* 16 (2005) 299-307.

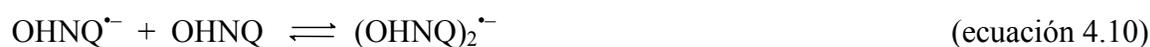
105 N. Macías-Ruvalcaba; D. Evans. Association reactions of the anion radicals of some hydroxyquinones: Evidence for formation of π - and σ -dimers as well as a neutral-anion radical complex. *J. Phys. Chem. C* 114 (2010) 1285-1292.

106 N. Macías-Ruvalcaba; G. Fenton; D. Evans. Contrasting behaviour in the reduction of 1,2-acenaphthylenedione and 1,2-acanthrylenedione. Two types of reversible dimerization of anion radicals. *J. Phys. Chem. C* 113 (2009) 338-345.

107 N. Macías-Ruvalcaba; N. Okumura; D. Evans. Change in reaction pathway in the reduction of 3,5-di-tert-butyl-1,2-benzoquinone with increasing concentration of 2,2,2-trifluoroethanol.

108 L. Hernández-Muñoz; M. Gómez; F. González; I. González; C. Frontana. Towards a molecular-level understanding of the reactivity differences for radical anions of juglone and plumbagin: an electrochemical and spectroelectrochemical approach. *Organic & Biomolecular Chemistry* 7 (2009) 1896-1903.

sitios hidroxílicos de la seminaftoquinona. Este complejo, a través de la transferencia de un protón, produce la seminaftoquinona protonada neutra $\text{OH}_2\text{NQ}^\bullet$ y la especie hidroxinaftoquinona desprotonada ${}^-\text{ONQ}$ (ecuación 4.11) o base conjugada de OHNQ . Mientras que la seminaftoquinona protonada se reduce en el potencial Ic aplicado (ecuación 4.12) provocando así un ligero aumento de la i_{pc}^{I} , su oxidación ocurre a potenciales ligeramente más anódicos e induce el ensanchamiento de Ia . Por otra parte, se ha demostrado que la seminaftoquinona además de sufrir dismutación/comproportionación (ecuación 4.13), en DMSO genera rápidamente un complejo $\pi\text{-(HNQ)}_2^{2-}$ (ecuación 4.14). La formación de éste se debe sólo a interacciones tipo π entre los anillos aromáticos de las dos seminaftoquinonas y se reduce en el mismo potencial de la señal IIc (ecuación 4.15) provocando complicaciones cinéticas más significativas (figura 4.5 panel C2). Finalmente, las ecuaciones anteriormente descritas no explican la presencia de la señal V. Algunos autores se han dado a la tarea de demostrar que la presencia de Va se debe a la oxidación de ${}^-\text{ONQ}$ mediante un mecanismo ECCE (ecuación 4.16).^{105,106,108} Mientras que la señal Vc que se observa a un potencial más catódico, se pudo atribuir mediante la simulación de voltamperogramas a condiciones cercanas a las experimentales, a la reducción del producto que se forma en Va (véase tabla A1.3 y figuras A1.3-A1.5 en anexo1). Sin embargo, la demostración total de esto, requiere de otros experimentos que salen del objetivo de este trabajo.



Finalmente, el desplazamiento anódico de los potenciales I y II puede atribuirse a la estabilización de las especies por los puentes de hidrógeno intramoleculares, que son más importantes que la débil acidez del grupo -OH, así como su efecto inductivo y electrodonador, tal como se menciona en diversas publicaciones.^{102,103,109,110,111,112}

En 2SO₃KNQ (figura 4.4, panel D) se observó una señal adicional de oxidación y una de reducción a potenciales más anódicos con respecto a I, VIa y VIc respectivamente. La señal VIa no se aprecia desde el inicio en los voltamperogramas cuando se obtienen en dirección anódica o catódica, ni con los estudios de $E_{-\lambda}$ justo al comienzo de Ic (zoom en figura 4.4, panel D). Es hasta después de que la señal IIc se transforma a IIa que aparece VIa, lo que indica que ésta se origina directamente de las especies generadas en IIc. Estudios de $E_{-\lambda}$ confirman la propuesta anterior y demuestran que la especie oxidada en VIa se forma a partir de las especies reducidas en IIc. Por otra parte, la especie que se oxida en VIa puede considerarse estable, ya que permanece aún después de llevarse a cabo las oxidaciones IIa y Ia. A diferencia de otras señales adicionales, a ν altas la señal VI conserva el comportamiento electroquímico, el análisis de $|i_p/\nu^{1/2}|$ en función de ν sugiere la presencia de reacciones acopladas y/o ligeras complicaciones cinéticas (datos no se muestran). Se ha informado que en medio acuoso, la 2SO₃KNQ se auto oxida hidrolíticamente de manera espontánea (ecuación 4.17). Este mecanismo, es inducido por la activación del anillo para un ataque nucleofílico, provocado por la presencia del grupo sulfonato. Como resultado de esto, se generan otras especies reactivas que a su vez, pueden oxidarse y de esta forma, la 2SO₃KNQ puede inducir estrés oxidativo en las células.¹¹³ Entonces, si la presencia de ⁻OH en el medio es un generador de esta serie de reacciones, la humedad residual en el DMSO podría explicar la señal VIa. El contenido de agua de un disolvente seco no es

109 B. Eiggins, J. Chambers, Proton effects in the electrochemistry of the quinone hydroquinone system in aprotic solvents. *J. Electrochem. Soc.* 117 (1970) 186–192.

110 M. Gómez, F. González, I. González, A model for characterization of successive hydrogen bonding interactions with electrochemically generated charged species. The quinone electroreduction in the presence of donor protons. *Electroanalysis* 15 (2003) 635–645.

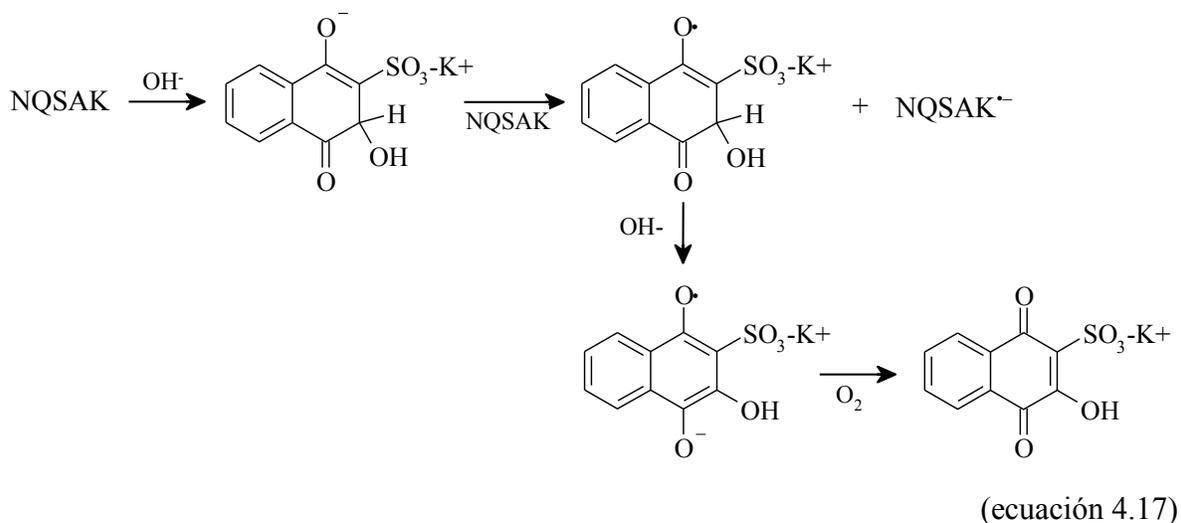
111 M. Aguilar-Martínez, N. Macías-Ruvalcaba, J. Bautista-Martínez, M. Gómez, F. González, I. González. Review: Hydrogen Bond and Protonation as Modifying Factors of the Quinone Reactivity. *Curr. Org. Chem.* 8 (2004) 1721–1738.

112 P. Astudillo, J. Tiburcio, F. González, The role of acids and bases on the electrochemical oxidation of hydroquinone: Hydrogen bonding interactions in acetonitrile. *J. Electroanal. Chem.* 604 (2007) 57–64.

113 P. J. Thornalley, A. Stern; The hydrolytic autoxidation of 1,4-naphthoquinone-2-potassium sulphonate: implications for 1,4-naphthoquinone-2-potassium sulphonate-induced oxidative stress in the red blood cell. *Chem. Biol. Interact* 17 (1985) 55-71.

insignificante; sin embargo, a menudo se supone que la respuesta voltamperométrica no es afectada ya que es de esperarse que las interacciones disolvente-sustrato sean más significativas que las sustrato-agua,¹¹⁴ pero aún así, éstas pueden ocurrir. Los estudios de E_{λ} demostraron que la señal VIa depende de IIc, es decir que está asociada a $2\text{SO}_3\text{KNQ}^{2-}$. Entonces, la protonación de esta especie con la humedad residual del disolvente podría dar origen a VI ($2\text{SO}_3\text{KNQH}_2$), ya que su oxidación tendría que observarse a valores más anódicos con respecto a su análogo desprotonado.

Finalmente el ligero desplazamiento de I y II con respecto a NQ puede atribuirse al efecto inductor (electroatractor) del grupo sulfonato que facilita la reducción de la quinona. Este efecto parece más importante que la débil basicidad del grupo sulfonato, provocando que su potencial sea como el de NQ ($\Delta E = 7 \text{ mV}$).



Hasta ahora, se ha demostrado que las NQs en estudio, se comportan como especies básicas cuyo potencial de reducción (E_{red}) depende de propiedades e interacciones propias de su estructura química. Por ejemplo en la 2MeONQ, el grupo electrodonador -OMe le confiere un efecto inductivo al núcleo NQ, provocando el desplazamiento de su E_{red} (-)106 mV (con respecto a NQ) por ser un efecto estructural importante. En la 2NH₂NQ, el grupo electrodonador -NH₂ además de otorgar un efecto inductivo, favorece el desplazamiento de

114 Y. Hui, E. Khim, C. Lin, H. Poh, R. Webster. Hydrogen-bonding interactions between water and the one and two-electron-reduced forms of vitamin K1: applying quinone electrochemistry to determine the moisture content of non-aqueous solvents. JACS 131 (2009) 1523-1534.

E_{red} (-)272 mV por su basicidad; haciendo que éste, sea un efecto aún más importante. Para la 5OHNQ, el efecto inductivo que provoca al anillo y el hecho de que sea un grupo electrodonador pierden importancia. La capacidad de formar puentes de hidrógeno intramoleculares que estabilicen la estructura y faciliten su reducción, resultan ser más importantes, provocando un desplazamiento del E_{red} (+)182 mV. Finalmente, el hecho de que el grupo $-\text{SO}_3$, un grupo electroattractor, proporcione un efecto inductivo poco importante, E_{red} (+) 7 mV, sugiere que su capacidad como electroattractor es menos significativo inclusive que su basicidad.

Por otra parte, al comparar 2NH₂NQ y 2SO₃KNQ ($-\text{NH}_2$ grupo electrodonador y $-\text{SO}_3^-$ grupo electroattractor, misma posición), se observa que los sustituyentes producen una modificación del $E_{1/2}$ con respecto a NQ de (-)272 y (+)7 mV respectivamente. Resultados similares se han informado para otras quinonas sustituidas.^{115,116} Interessantemente, la mayor diferencia de $E_{1/2}$ se observa entre 2NH₂NQ y 5OHNQ ($\Delta E_{1/2}$ 454 mV entre ellos y de -272 y +182 mV con respecto a NQ respectivamente) a pesar de que ambos grupos ($-\text{NH}_2$ y $-\text{OH}$) son electrodonadores.

De acuerdo con lo anterior, se seleccionaron a 2NH₂NQ y 5OHNQ para realizar los ensayos electrofisiológicos (EF) ya que presentaron la mayor diferencia de potencial entre ellos y con respecto a NQ. A su vez, estas NQs tienen diferentes efectos estructurales importantes a evaluar tales como basicidad y formación de puentes de hidrógeno además del inductivo. En este trabajo, se utilizaron los valores de potencial redox como parámetro de comparación para entender y/o explicar las posibles diferencias de reactividad de las NQs frente a los canales iónicos. Dado que los EF requieren de un medio acuoso con fuerza iónica, pH y composición específicos (disolución fisiológica denominada ND 96), se determinaron los potenciales de reducción de NQ, 2NH₂NQ y 5OHNQ en medio ND 96 y a continuación, se presentan los resultados. Finalmente la obtención de potenciales y

115 J. E. Heffner, C. T. Wigal, O. A. Moe, Solvent dependence of the one-electron reduction of substituted benzo- and naphthoquinones. *Electroanalysis* 9 (1997) 629–632.

116 C. Frontana, A. Vázquez-Mayagoitia, J. Garza, R. Vargas, I. González, Substituent effect on a family of quinones in aprotic solvents: An experimental and theoretical approach. *J. Phys. Chem. A* 110 (2006) 9411–9419.

elucidación de posibles especies generadas en medio ND 96 podrían sugerir la forma de interacción de la NQ con los canales iónicos.

4.1.3. Caracterización de NQ en medio prótico (ND 96).

En un intento de emular en lo posible el ambiente de los ensayos EF, se obtuvo el dominio de electroactividad en ND 96 a una velocidad de 0.1 V/s partiendo de OCP; el intervalo de potencial que establecen las barreras fue de -1.4 a 1.3 V. Después de añadir etanol a una concentración de 200 mM (misma cantidad que se emplea en los ensayos EF y EQ en medio acuoso) no hay señales adicionales o modificación de las barreras (los datos no se muestran). Al agregar NQ para alcanzar una concentración de $100 \mu\text{M}$ y trazar los voltamperogramas en dirección catódica se obtuvieron dos señales; una reducción I_c y una de oxidación I_a en -0.45 y -0.23 V respectivamente (figura 4.6). Se observa que la reducción de NQ en medio acuoso se modifica drásticamente y pasa de una transferencia en dos etapas a una sola, que se considera lenta en la escala de tiempo de los experimentos.

Se ha propuesto que la reducción de quinonas en medio acuoso tiene como producto final a la hidroquinona QH_2 , cuyo proceso, puede modificarse de acuerdo con las condiciones experimentales empleadas. En particular, en ausencia de un sistema amortiguador, el mecanismo redox de las quinonas se altera principalmente por el cambio de pH en la superficie del electrodo. Por otra parte, se ha comprobado que las especies ácidas y básicas, componentes del amortiguador, tienen influencia en los procesos de óxido-reducción de las quinonas.^{114,117,118} De acuerdo con lo informado en medios amortiguados, en ND 96 la reducción de NQ involucra una transferencia bielectrónica en conjunto con dos protones, cuyo resultado final es la hidronaftoquinona, NQH_2 , tal como se muestra en la ecuación 4.18.^{117,118}

117 M. Quan, D. Sanchez, M. Wasylkiw, D. Smith. Voltammetry of quinones in unbuffered aqueous solution: reassessing the roles of proton transfer and hydrogen bonding in the aqueous electrochemistry of quinones. JACS 129 (2007) 12847-12856.

118 P. Guin, S. Das, P. Mandal. Electrochemical reduction of quinones in different media: a review. Int. J. Electrochem. 2011 (2011) 1-22.

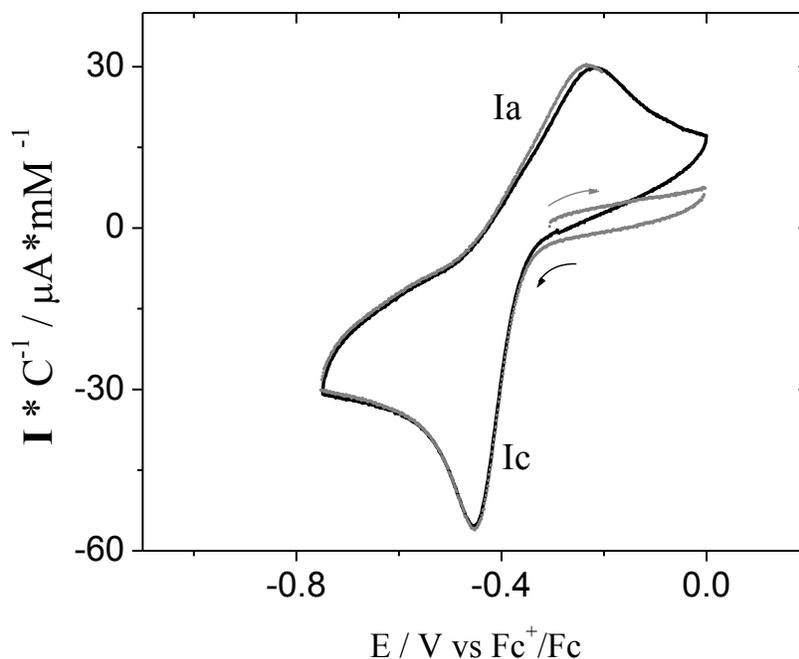


Figura 4.6. Voltamperograma de 100 μM de NQ en medio ND 96 en dirección catódica (–) y anódica (*) comenzando desde OCP a una velocidad de barrido de potencial de 0.1 V/s, E_T carbón vítreo (ϕ 7.1 mm^2), E_{aux} Pt° y E_{ref} electrodo acuoso de $\text{Cl}^-(0.1\text{M})/\text{AgCl}/\text{Ag}^\circ$.



Se obtuvieron voltamperogramas a velocidades de barrido de potencial de 0.02 a 1 V/s (figura 4.7) y con base en los resultados se analizaron los valores de las corrientes (figura 4.8). Se observa que en medio acuoso, la variación de ν afecta ligeramente a I_c pero de manera considerable a I_a ; incluso en ν cercanas a 1 V/s ésta se distorsiona en otras señales de oxidación (marcadas \downarrow en figura 4.7). La señal I_c presenta un desplazamiento de potencial de (-)47 mV en el intervalo de ν empleado, mientras que I_a se desplaza hasta (+)150 mV. Se determinó que el ΔE_p a 0.02 V/s, $|\Delta E_p|^{0.02\text{V/s}}$, es de 160 mV mientras que $|\Delta E_p|^{1\text{V/s}}$ es de 327 mV (figura 4.8 panel B). Lo anterior, es un indicativo de que el proceso redox global de NQ en ND 96 se vuelve cinéticamente más lento conforme aumenta ν ; en particular, se observa que se afecta más la oxidación. Se ha informado que las especies componentes de la disolución amortiguadora, colaboran con la reducción de las quinonas haciéndola termodinámicamente más fácil, (+) E_{red} , aunque cinéticamente más lento el proceso electroquímico total, aumento de ΔE_p , con respecto a su homólogo en disoluciones sin amortiguar.^{116,118}

Por otra parte, el comportamiento lineal de la variación $|i_{pc}|$ e $|i_{pa}|$ en función de $v^{1/2}$ (figura 4.8 panel A) propone un proceso electroquímico controlado por la difusión (para valores véase tabla A1.4 en anexo 1). La correspondencia de $|\Delta E_p|$ en función de v (figura 4.8 panel B), la relación $|i_{pa}/i_{pc}|$ diferente de uno (figura 4.8 panel C) y el análisis de $|i_p/v^{1/2}|$ (figura 4.8 panel D), sugieren un mecanismo electroquímico con reacciones químicas acopladas y/o complicaciones cinéticas con productos no tan estables en la escala de tiempo de los experimentos. Como ya se había mencionado, los componentes del amortiguador estabilizan las cargas de las especies generadas durante la reducción, modificando así de manera secundaria sobre todo a los procesos de oxidación, en cuanto a su potencial y cinética. Se ha propuesto que la reducción de las quinonas en medio neutro amortiguado sigue un mecanismo EHEH (ecuaciones 4.19- 4.22, véase mecanismo figura A1.6 en anexo 1) donde el electrón debe ser transferido primero para que los equilibrios de protonación ocurran. La transferencia electrónica en este proceso es una limitante cinética, ya que en el caso de las quinonas, en medio acuoso no es generalmente rápida. Por lo tanto, ésta debe darse por etapas seguida de la transferencia de protones, dando lugar inclusive a un comportamiento menos reversible de las señales.^{114,115} El hecho de que la especie protonada NQ^*H sea más fácil de reducir que su homólogo desprotonado NQ^{*-} y que los potenciales de reducción de NQ y NQ^*H sean tan parecidos, hacen que sólo se observe una señal de reducción, I_c . En algunas ocasiones, las reacciones de DISP debido a las propiedades básicas de las especies electrogeneradas, también modifican el comportamiento de las señales. Actualmente, no hay suficiente evidencia para sugerir que la transferencia electrónica y de protones en quinonas en medio acuoso pudiera darse de manera concertada. A v bajas se observa solo una señal de oxidación, I_a , mientras que a v altas se distinguen hasta tres. Algunos autores atribuyen I_a a la oxidación de NQH_2 asociada a la base conjugada del donador de protones presente en disolución o como en este caso, a la base conjugada del amortiguador (BA^-). Por otra parte, se ha demostrado que NQ^*H no es una especie estable, por lo que genera un complejo dimérico estabilizado fuertemente vía puentes de hidrógeno (ecuación 4.23), mecanismo ECEC-DISP1.¹¹² Este a su vez, al oxidarse (ecuación 4.24) a potenciales más positivos que sus análogos no complejados, genera especies libres (ecuación 4.25) que pueden también perder electrones.

Entonces, las oxidaciones de $[NQ^{2-}\cdots NQH_2]$ y $NQ^{\bullet-}$ pueden justificar las señales extras a Ia, así como el hecho de que la relación $|i_{pa}/i_{pc}|$ sea menor a 1.

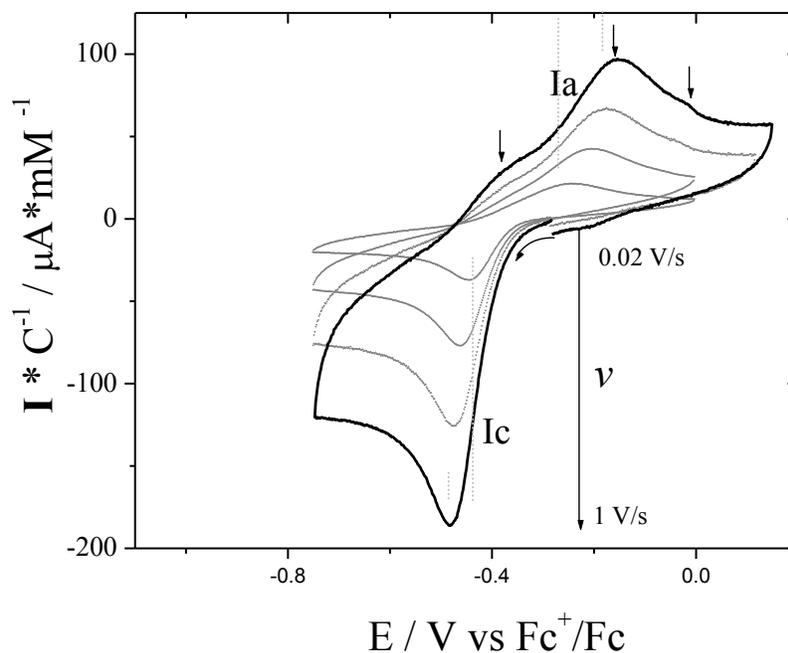
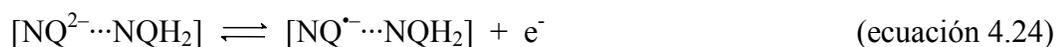


Figura 4.7. Voltamperogramas de 100 μM de NQ en medio ND 96 en dirección catódica comenzando desde OCP a diferentes velocidades de barrido de potencial. E_T carbón vítreo (ϕ 7.1 mm^2), E_{aux} Pt° y E_{ref} electrodo acuoso de $\text{Cl}(0.1\text{M})/\text{AgCl}/\text{Ag}^\circ$. Sólo se muestran los voltamperogramas a 0.02, 0.1, 0.5 y 1 V/s.

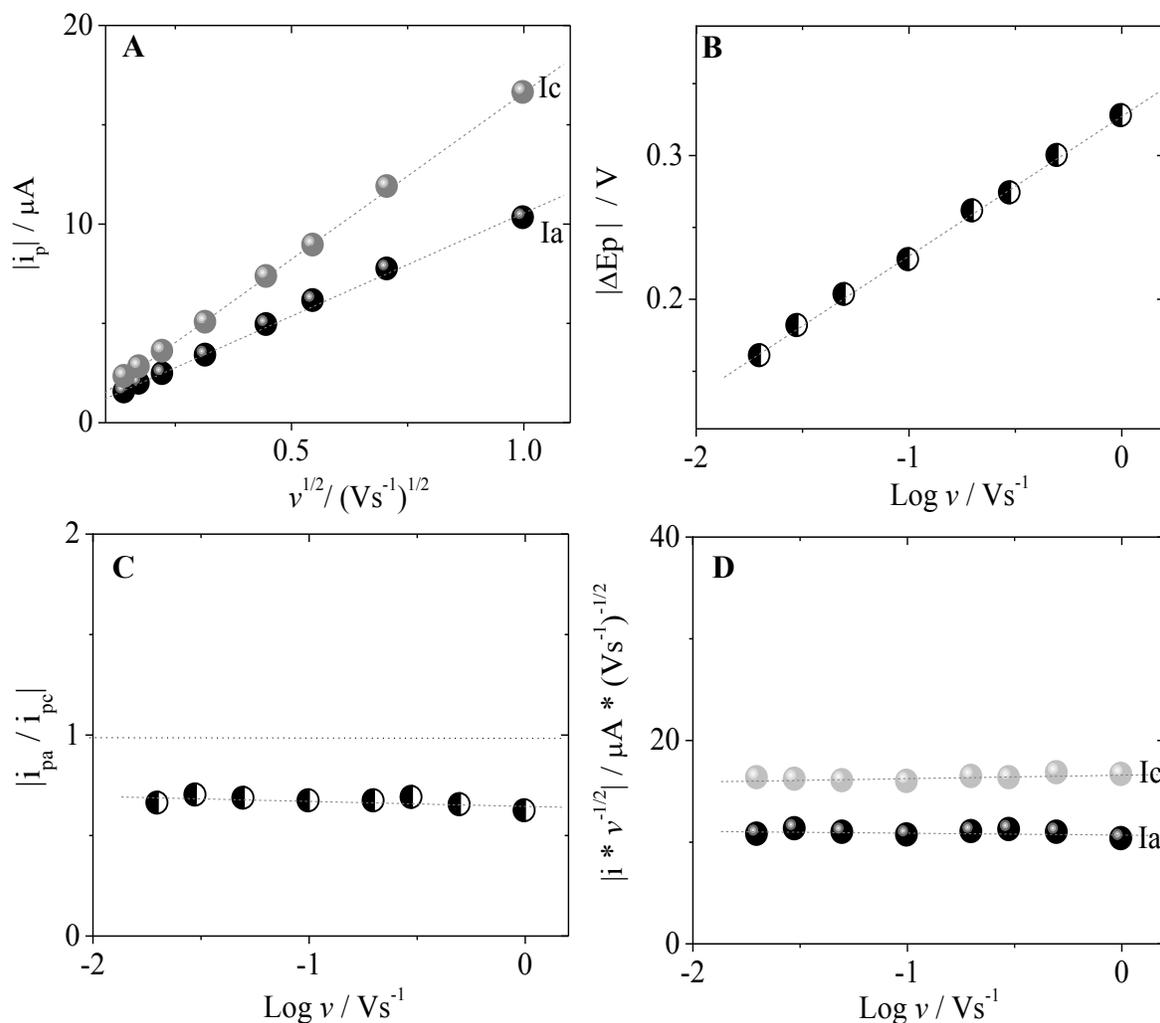


Figura 4.8. Análisis de A) $|i_p|$ en función de $v^{1/2}$ B) $|\Delta E_p|$ C) $|i_{pa}|/|i_{pc}|$ y D) $|i_p/v^{1/2}|$ en función de $\text{Log } v$.

Diversos grupos de trabajo se han dado la tarea de demostrar que en medio aprótico (ACN, DMF, DMSO) en presencia de agua, la señal de reducción $Q^{\cdot-}/Q^{2-}$ se desplaza hacia potenciales anódicos casi hasta unirse con la de $Q/Q^{\cdot-}$, mostrando así, un comportamiento similar al observado en medio acuoso. Sugieren que en presencia de agua, las especies reducidas se encuentran fuertemente solvatadas haciendo termodinámicamente más fácil su siguiente reducción; tanto, que los valores de potencial se aproximan hasta observar solo una onda voltamperométrica. Entonces, podría decirse que una de las diferencias fundamentales entre la electroquímica de las quinonas en agua y en disolventes apróticos polares no es la transferencia de protones como tal, pero si los puentes de hidrógeno.

Es claro que ya que los mecanismos de reducción de las quinonas en medio aprótico y acuoso amortiguado son distintos entre sí, su comparación no debe hacerse tan directa. Sin embargo, el objetivo de este trabajo es intentar elucidar si el potencial redox de NQ está relacionado (y si lo está, de qué forma) con la actividad de los canales iónicos de interés y no propiamente con su mecanismo de reducción. Por ello, se establece como parámetro de confrontación estructural al potencial de reducción de NQ en ambos sistemas, ya que éste podría ser un indicativo de la facilidad de interacción con sitios redox en las proteínas. En medio acuoso se utilizaron los valores de E_{pc}^{Ic} ($E_{pc}^{Ic}{}_{NQ} -0.45$ V) como medida de comparación.

Descrito el sistema base NQ en medio acuoso ND 96, se realizó de la misma forma y a las mismas condiciones de trabajo la caracterización de 2NH₂NQ y 5OHNQ ya que presentaron la mayor diferencia de potencial con respecto a NQ en DMSO.

4.1.4. Caracterización de NQ's en medio prótico.

Los voltamperogramas de 2NH₂NQ y 5OHNQ en ND 96 se obtuvieron de la misma forma que la NQ y en la figura 4.9 se presenta su comparación. En ambos casos, se encontró una señal de reducción (I_c) en el intervalo de -0.8 a 0 V (vs Fc^+/Fc). Dada la similitud con los voltamperogramas de NQ, se puede sugerir que I_c corresponde a una transferencia bieletrónica en conjunto con dos protones (ecuación 4.17) y cuya de oxidación (I_a) aparece a potenciales más anódicos. Cuando se obtienen los voltamperogramas a diferentes ν (0.02 a 1 V/s) se observó que a ν altas, la señal I_a de 2NH₂NQ se distorsiona de manera semejante a NQ, mientras que la de 5OHNQ no se modifica (figura 4.10). Por otra parte, las señales I_c de 2NH₂NQ y 5OHNQ presentaron desplazamientos similares a NQ (-52 y -44 mV en el intervalo de ν empleado. A diferencia de las I_a que presentaron menor corrimiento anódico en comparación con NQ ($+76$ y $+60$ mV respectivamente (figura 4.10). Estos desplazamientos, son un indicativo que la cinética y termodinámica de oxidación de 2NH₂NQ y 5OHNQ en condiciones acuosas, se modifican menos que en el caso de la NQ; esto seguramente, se debe a la estabilidad que le confieren los grupos funcionales ($-NH_2$ e $-OH$) a las especies que se generan durante la reducción (véase

mecanismo en figura A1.7 y A1.8 de anexo 1). El efecto resulta más notorio con la 5OHNQ, donde los $|\Delta E_p|$ disminuyen a la mitad con respecto a NQ $|\Delta E_p|^{0.02V/s}$ 41 mV y $|\Delta E_p|^{1V/s}$ 145 mV; mientras que los de 2NH₂NQ se aproximan a los de NQ, $|\Delta E_p|^{0.02V/s}$ 158 y $|\Delta E_p|^{1V/s}$ 286 mV (figura 4.11, panel A). De acuerdo con lo anterior puede suponerse que, aunque los componentes del amortiguador colaboran con la oxidación de las quinonas, en el caso de 5OHNQ las interacciones que favorecen aún más a la estabilización de las especies electrogeneradas, son los puentes de hidrógeno. Algunos autores han demostrado que las quinonas reaccionan con nucleobases derivados de timina y adenina mediante mecanismos que involucran reacciones de protonación y asociación vía puentes de hidrógeno como las antes descritas.¹¹⁹

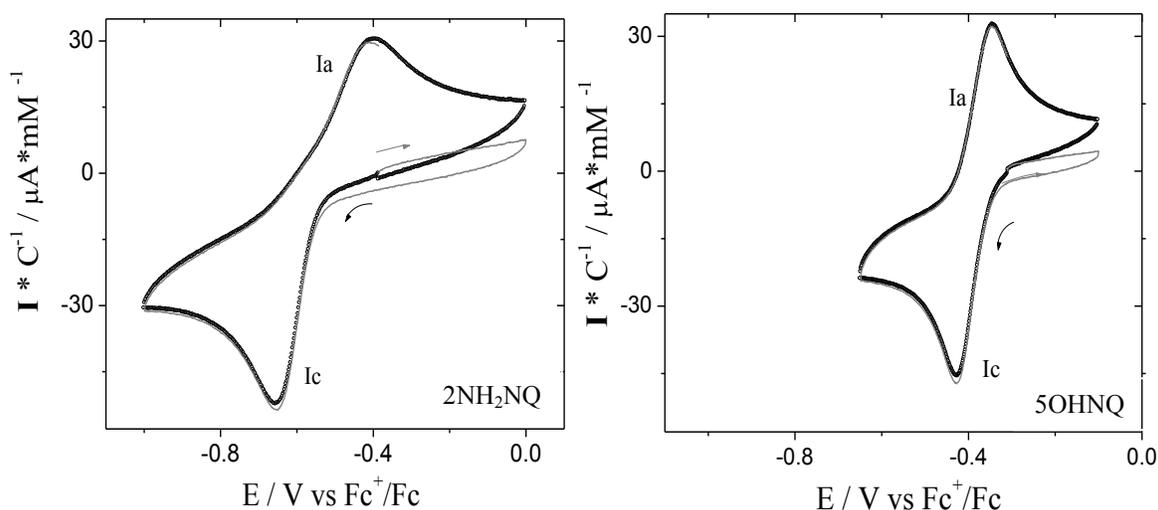


Figura 4.9. Voltamperogramas de 100 μM de A) 2NH₂NQ y B) 5OHNQ en ND 96 como electrolito soporte en dirección catódica (•) y anódica (–) desde OCP a una velocidad de barrido de potencial de 0.1 V/s, E_T carbón vítreo (ϕ 7.1 mm²), E_{aux} Pt° y E_{ref} electrodo acuoso de Cl⁻(0.1M)/AgCl/Ag°.

119 Salas, M.; Gómez, M.; González, F.; Gordillo, B. Electrochemical reduction of 1,4-benzoquinone. Interaction with alkylated thymine and adenine nucleobases. J. Electroanal. Chem. 543 (2003) 73-81.

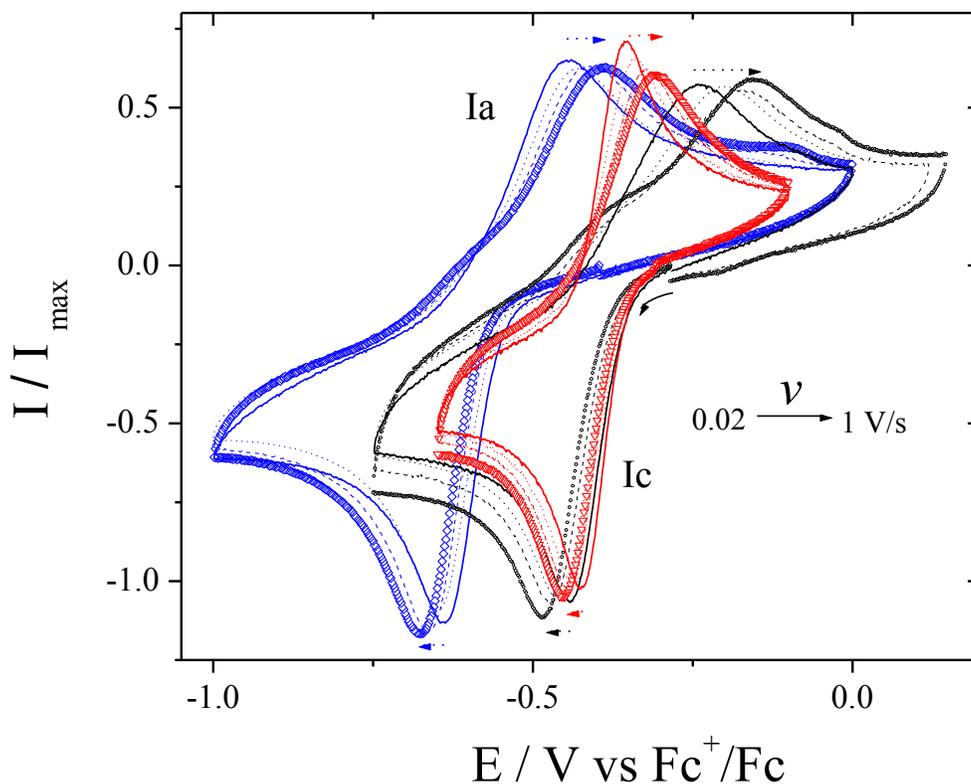


Figura 4.10. Voltamperogramas de 100 μM de $2\text{NH}_2\text{NQ}$ (azul), NQ (negro) y 5OHNQ (rojo) en ND 96 como electrolito soporte en direcci3n cat3dica desde OCP a velocidades de barrido de potencial de 0.05 (–), 0.2 (··), 0.5 (–·) y 1 V/s (\diamond , \circ , Δ respectivamente), E_T carb3n v3treo (ϕ 7.1 mm²), E_{aux} Pt⁰ y E_{ref} electrodo acuoso de Cl[–] (0.1M)/AgCl/Ag⁰.

Por otra parte el an3lisis de $|i_p|$ en funci3n de v de $2\text{NH}_2\text{NQ}$, muestra un dram3tico cambio de pendiente de I_a que sugiere la presencia de dos tipos de mecanismos de oxidaci3n; uno que ocurre a v bajas y otro diferente a partir de 0.2 V/s (figura 4.11 panel B). La cin3tica de oxidaci3n evaluada como $|i_p^{I_a}/v^{1/2}|$ (figura 4.11 panel C) tambi3n se ve alterada a partir de 0.2 V/s, pero la termodin3mica de los dos procesos se conserva (figura 4.11 panel A). Este tipo de patr3n se ha observado con algunos compuestos nitroarom3ticos.⁹⁹ Entonces, con $2\text{NH}_2\text{NQ}$, se tiene un sistema m3s complicado a partir de 0.2 V/s en cuanto a sus procesos de oxidaci3n; sin embargo, cabe recordar que se fij3 como par3metro de confrontaci3n estructural de las NQs en este estudio el potencial de reducci3n y no sus mecanismos como tales.

En resumen, similar a lo observado con NQ, el an3lisis general de $|\Delta E_p|$, $|i_p|$, $|i_p/v^{1/2}|$ e $|i_{pa}/i_{pc}|$ en funci3n de v (figura 4.11) de $2\text{NH}_2\text{NQ}$ y 5OHNQ , sugieren un mecanismo de reducci3n

ECE-DISP1 con complicaciones cinéticas (valores véase tabla A1.4, Anexo 1). Así mismo, el desplazamiento (-) de la señal I_c fue del mismo orden para las NQs mientras que el de la (+) fue más importante para NQ. En el caso de 2NH₂NQ ocurre un cambio en el mecanismo de oxidación a partir de 0.2 V/s, generando así un sistema más complejo de elucidar. A diferencia de las otras NQs, durante la reducción de NQ, se genera una semiquinona simétrica que no se observa con las otras; ésta es la más básica y no se encuentra estabilizada mediante puentes de hidrógeno intramoleculares como en el caso de 2NH₂NQ y 5OHNQ (véanse figuras A1.6, A1.7 y A1.8).

Los valores de E_{pc}^{Ic} obtenidos en ND 96 se muestran en la Tabla 4.2. Se observa que, a pesar de la naturaleza del disolvente y del cambio de los mecanismos óxido-reducción, los E_{pc} mantienen el mismo orden que los $E_{1/2}$ determinados en DMSO. Es decir, la 2NH₂NQ mantiene su posición relativa en la escala con el potencial más reductor, mientras que, 5OHNQ presenta el potencial más oxidante. En esta ocasión, la diferencia de potenciales entre las especies seleccionadas 2NH₂NQ y 5OHNQ fue de 210 mV (la mitad de lo calculado en DMSO). Lo anterior, sugiere que las especies que se forman durante su reducción se estabilizan más fácilmente haciendo que los efectos electrónicos sean menos significativos debido a la importancia de las interacciones vía puentes de hidrógeno.

ND 96		
Compuesto	E_{pc}^{Ic} (V)	E_{pa}^{Ia} (V)
2NH ₂ NQ	-0.64	-0.45
NQ	-0.45	-0.23
5OHNQ	-0.43	-0.35

Tabla 4.2: Valores de E_{pc} determinados en medio ND 96 / V (vs Fc⁺/Fc)

Los resultados obtenidos en medio DMSO y ND 96 demostraron que las diferencias estructurales de las NQs ejercen un efecto importante sobre el potencial redox y por lo tanto, éste podría estar relacionado también con la inhibición de Kv1.3. A la vez, sugieren que la formación de puentes de hidrógeno y la transferencia de protones, podrían ser una clave importante en el control del mecanismo redox y potencial de reducción de las quinonas. En un intento de verificar estas hipótesis, se llevaron a cabo ensayos electrofisiológicos con 2NH₂NQ, NQ y 5OHNQ con el objeto de evaluar su efecto sobre las corrientes de rKv1.3 y dShIR.

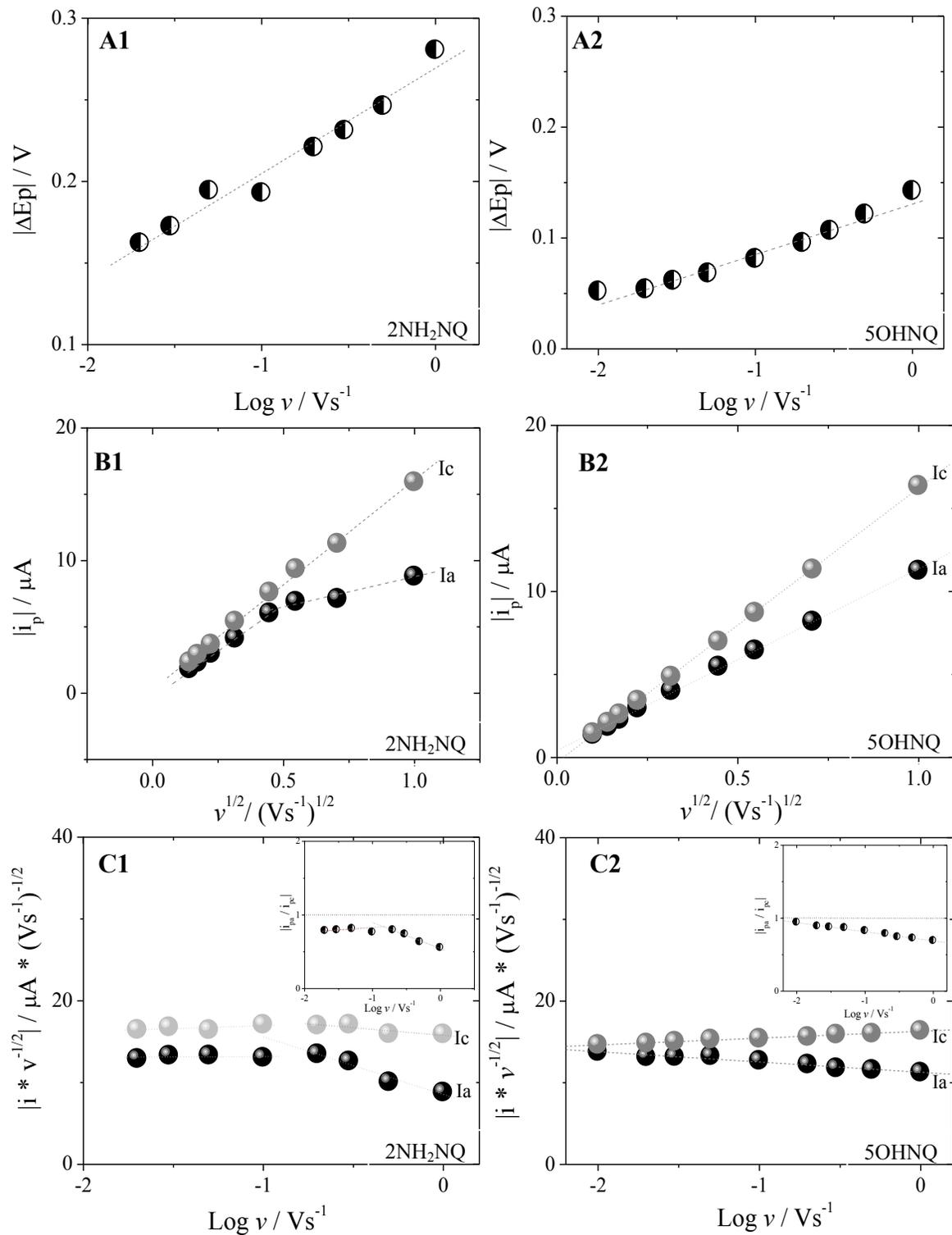


Figura 4.11 Análisis de: A) $|\Delta E_p|$ en función de $\text{Log } v$, B) $|i_p|$ en función de v y C) $|i_p/v^{1/2}|$ en función de $\text{Log } v$, inserto $|i_{pa}/i_{pc}|$ en función de $\text{Log } v$ de: 1) 2NH₂NQ, 2) 5OHNQ.

CAPÍTULO 5

ESTUDIOS ELECTROFISIOLÓGICOS (EF)

Continuando con el estudio de la posible modulación de la actividad de rKv1.3 y dShIR en función del potencial redox de NQ, se llevaron a cabo EF por TEVC. Previamente, se analizó el comportamiento electroquímico de NQ en medio acuoso y no acuoso intentando mimetizar los ambientes celulares. Se demostró que el E_{red} de NQ está íntimamente relacionado con efectos que le confieren los sustituyentes al núcleo NQ, el medio y las interacciones que en este se generan. Mediante VC se determinó que con base en la mayor diferencia de potencial redox que los mejores candidatos a ser evaluados por TEVC son 2NH₂NQ, NQ y 5OHNQ. A continuación, se presentan los resultados obtenidos mediante el empleo de técnicas electrofisiológicas comunes (TEVC) útiles en el estudio de los canales iónicos rKv1.3 y dShIR.

Los canales iónicos son poros acuosos que se abren y/o cierran en respuesta a estímulos específicos como cambios en el voltaje, presencia de ligandos intra o extracelulares o estrés mecánico. Cuando se abren, permiten el paso de Na⁺, K⁺, Ca²⁺ o Cl⁻ de manera selectiva a través de la membrana a favor de un gradiente electroquímico.¹²⁰ Los canales de potasio activados por voltaje (Kv) han sido profundamente estudiados y caracterizados debido a su ubicuidad, diversidad del mecanismo de compuerta, farmacología y propiedades conductoras. En células excitables, los Kv se abren rápidamente a partir de un potencial umbral de -20 a +60 mV promoviendo la salida de K⁺. Están involucrados principalmente en procesos de excitabilidad neuronal, cardiacos y contracción muscular. Algunos como el Kv1.3, están íntimamente relacionados con células no excitables como los linfocitos T y

120 Aidley, D. J.; Stanfield, P. R. *Ion Channel Molecules in Action* (1996) Cambridge, University Press, New York, 1996.

túbulos renales.^{121,122} En comparación, el canal Shaker (homólogo de Kv1.1) es vital en la excitabilidad de las células fotorreceptoras en *D. melanogaster* (dSh).

Se ha informado de manera extensa que la actividad de este tipo de proteínas se ve modificada drásticamente en presencia de algunas fármacos, drogas y péptidos. Sin embargo, poco se conoce acerca de la modulación de canales iónicos mediante compuestos como las quinonas. Dado que los procesos de transducción de señales que se llevan a cabo en la membrana tienen en su mayoría productos con actividad oxidante, la presencia y/o ausencia de compuestos con propiedades redox como la NQ, podría ser un mecanismo modulador importante de los canales iónicos.

5.1. DISCUSIÓN DE RESULTADOS ELECTROFISIOLÓGICOS

5.1.1. Efecto de NQ sobre las I_K de rKv1.3 y dShIR.

Para evaluar el efecto de NQ en los canales de K^+ rKv1.3 y dShIR se empleó la técnica de TEVC, como modelo biológico se usaron ovocitos de *Xenopus laevis*. Cuando los ovocitos en su forma nativa se estimularon mediante un protocolo de pulsos cuadrados de -60 a $+60$ mV con intervalos de $+20$ mV durante algunos milisegundos a partir de un potencial de mantenimiento de -60 mV, las corrientes que se obtuvieron fueron muy cercanas a cero (Inserto en figura 5.1B) por lo que se usaron como control negativo. Esto se debe a que en su forma nativa los ovocitos de *X. laevis* poseen poca cantidad de canales endógenos que conducen en este intervalo de potencial. Como otro control negativo, algunos ovocitos se inyectaron con agua bi-destilada con el fin de demostrar que ésta manipulación de las células no modifica las corrientes de los mismos. Los registros que se obtuvieron presentaron la misma forma que los nativos (los datos no se muestran). Entonces de acuerdo con lo anterior, las modificaciones de corriente que se observen en presencia de otros compuestos, pueden atribuirse a efectos directos sobre los canales y/o modulación de su apertura y no al tratamiento previo de los ovocitos.

121 L. Tu, A. Helm, W. Skach, C. Deutsch, Transmembrane Biogenesis of Kv1.3. *Biochem.* 39 (2000) 824-836.

122 L.I. Escobar, J.C. Martínez-Téllez, M. Salas, S. A. Castilla, R. Carrisoza, D. Tapia, M. Vázquez, J. Bargas, J. J. Bolívar. A voltaje-gated $K(+)$ current in renal inner medullary collecting duct cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 286 (2004) 965-974.

Posteriormente cuando los ovocitos se inyectan con cRNA, los canales se sobre-expresan a lo largo de la membrana y cuando se estimulan con el mismo protocolo de pulsos de potencial, se generan corrientes considerablemente mayores a las que se observaron con los ovocitos nativos. Estas corrientes se identificaron como corrientes salientes de potasio $I_K(rKv1.3)$ e $I_K(dShIR)$ para el canal rKv1.3 y dShIR respectivamente y se emplearon como control positivo (figura 5.1A y 5.1B respectivamente). Finalmente, las corrientes que se obtuvieron con el pulso de +60 mV se utilizaron como corrientes control $I_{control}$ (véase más adelante trazos *i* en figura 5.5) en ambos canales.

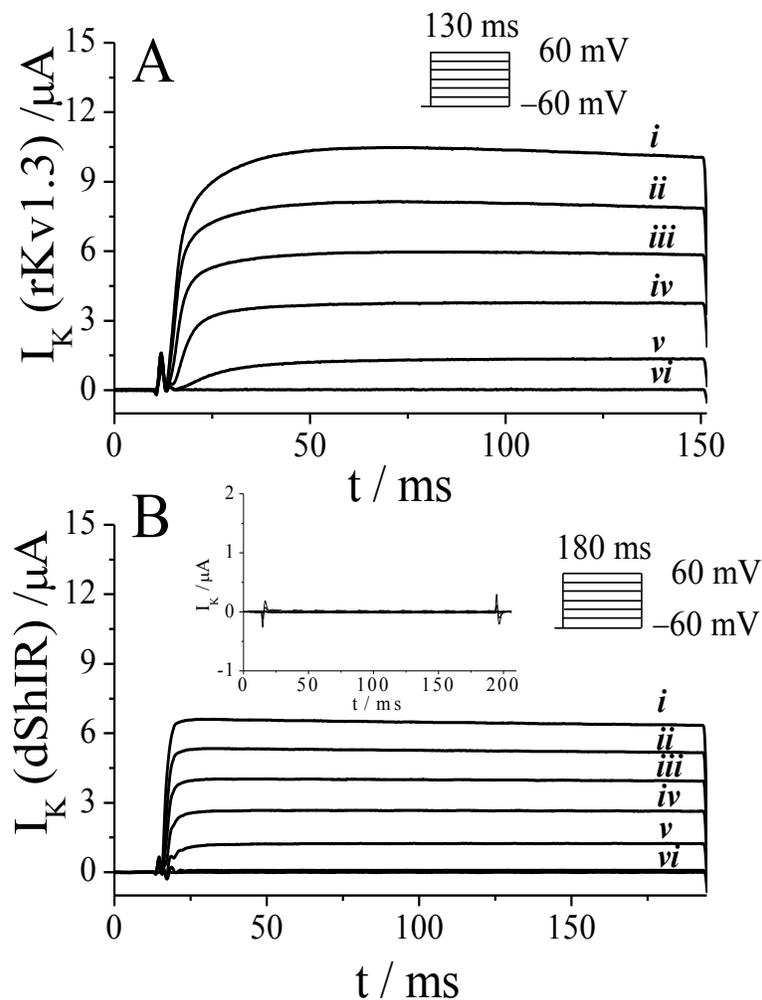


Figura 5.1. Corrientes salientes de potasio en función del tiempo para los canales rKv1.3 (A) y dShIR (B), $I_K(rKv1.3)$ y $I_K(dShIR)$ respectivamente, expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*. El potencial de mantenimiento empleado fue de -60 mV y el protocolo de pulsos fue -60 a +60 mV con incrementos de +20 mV durante 130 ó 180 ms. Trazos a +60(*i*), +40(*ii*), +20(*iii*), 0(*iv*), -20(*v*), -40 y -60(*vi*) mV. En el inserto se muestran las corrientes endógenas de los ovocitos nativos (control negativo).

Debido a que la NQ es poco soluble en medio acuoso 0.09g/L (569 μM) a 25 °C en H_2O pero muy soluble en EtOH, previo a la adición de NQ se evaluó el efecto del EtOH en los ovocitos a concentraciones de 20, 200 y 2000 mM. Los resultados demostraron que una concentración de hasta 200 mM de EtOH (10 μL de EtOH en 800 μL de ND 96) no modifica las corrientes de los controles (negativos y positivos). Es decir, que tanto los canales endógenos de los ovocitos como rKv1.3 y dShIR, no son sensibles a esta concentración de EtOH (figura 5.2, 5.3 y trazos *ii* en figura 5.5). Algunos canales de K^+ voltaje-dependientes son sensibles de manera reversible a la presencia de pequeñas concentraciones de EtOH^{123,124,125} aún desde 24 mM. Sin embargo, rKv1.3 y dShIR no presentaron este comportamiento. Adicionalmente, se realizaron ensayos con otros disolventes como DMSO y ACN donde la NQ es más soluble, pero todos estos provocaron el aumento considerable de las corrientes de fuga de los ovocitos que impidió fijar el potencial de manera adecuada. Con base en lo anterior, se decidió incorporar además, en todos los ensayos un blanco de 10 μL de EtOH, y las adiciones de éste no sobrepasaron la concentración de 200 mM.

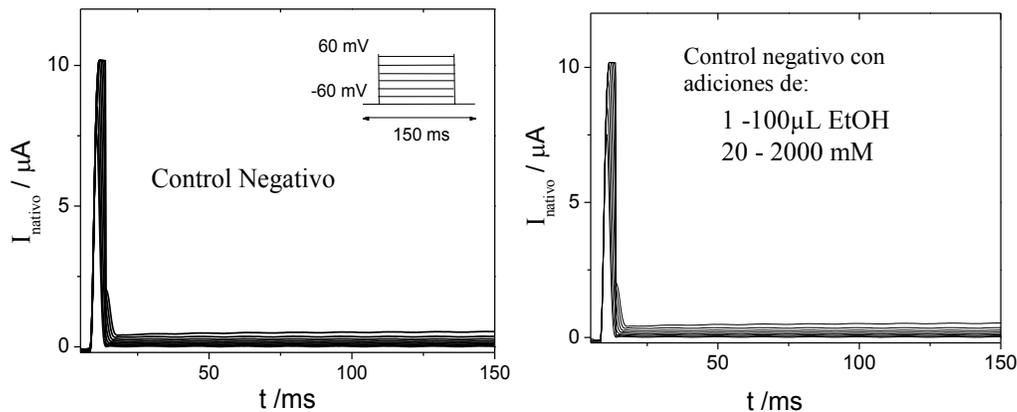


Figura 5.2. Gráficos $I=f(t)$ obtenidos con ovocitos nativos (controles negativos) evaluando el efecto del EtOH. El protocolo de pulsos utilizado fue -60 a +60 mV con intervalos de +20 mV partiendo desde un potencial de mantenimiento de la célula de -60 mV.

123 Dopico, A. Ethanol sensitivity of BKCa channels from arterial smooth muscle does not require the presence of the $\beta 1$ -subunit. *Am J Physiol Cell Physiol* 284 (2003) C1468–C1480.

124 Covarrubias, M.; Vyas, B.; Escobar, L.; Wei, A. Alcohols inhibit a cloned potassium channel at a discrete saturable site. *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 19408-19416.

125 Dopico, A.; Anantharam, V.; Treisman, S. Ethanol increases the activity of Ca^{++} -dependent K^+ (*mslo*) channels: Functional interaction with cytosolic Ca^{++} . *J. Pharm. Exp. Therapeutics* 284 (1998) 258-268.

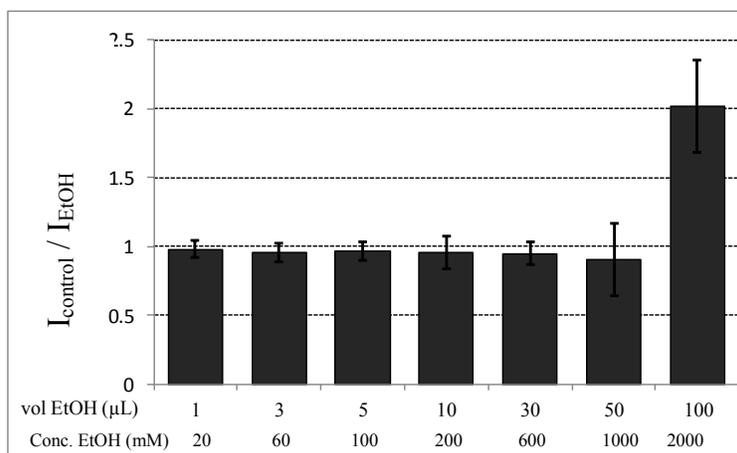


Figura 5.3. Gráfico de $I_{\text{control}}/I_{\text{EtOH}} = f(C_{\text{EtOH}})$ de controles positivos (rKv1.3)

Posteriormente, se evaluó el efecto de NQ sobre ovocitos nativos y se demostró que concentraciones de hasta 100 μM de NQ no modifican las corrientes endógenas (figura 5.4). Estos resultados, sirven de apoyo para una mayor confiabilidad en la interpretación de posibles modificaciones en las corrientes provocadas por NQ.

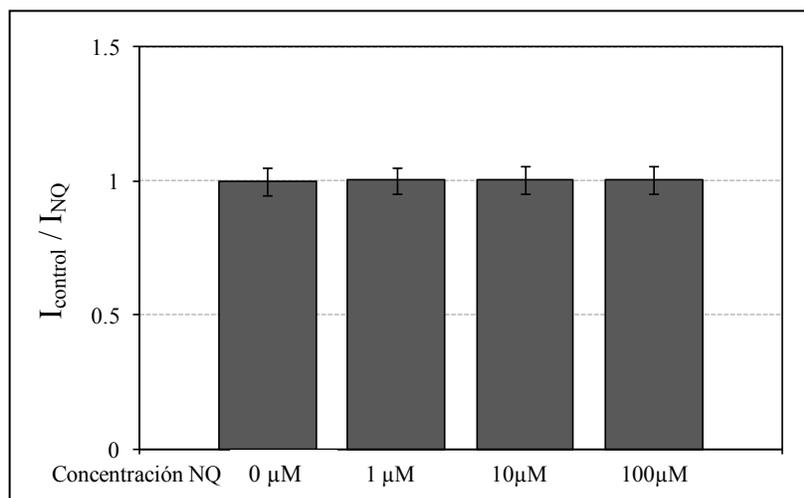


Figura 5.4 Gráfico de $I_{\text{control}}/I_{\text{NQ}} = f(C_{\text{NQ}})$ de ovocitos nativos en ausencia y presencia de NQ.

Finalmente, la adición de 100 μM de NQ en ovocitos heteroexpresados produce una clara disminución de la corriente de rKv1.3, mientras que en dShIR la misma concentración genera un efecto menor (trazos *iii*, figuras 5.5A y 5.5B, respectivamente). Después de lavados exhaustivos, el efecto sobre rKv1.3 no se recupera mientras que en dShIR prácticamente se elimina (trazos lavado, en figuras 5.5A y 5.5B, respectivamente). Los resultados demostraron que el efecto de NQ sobre rKv1.3 es irreversible mientras que sobre

dShIR es lo contrario. Lo anterior, sugiere que la interacción entre la NQ y el rKv1.3 es más importante en comparación con la que ocurre con dShIR; o bien, que quizás las interacciones con rKv1.3 provocan cambios conformacionales en la estructura del canal que justifican la falta de recuperación de las corrientes. Es interesante notar las diferencias significativas que se observan en la inhibición de los canales en estudio en presencia de NQ a pesar de que ambos pertenecen a la misma familia (Kv1.x).

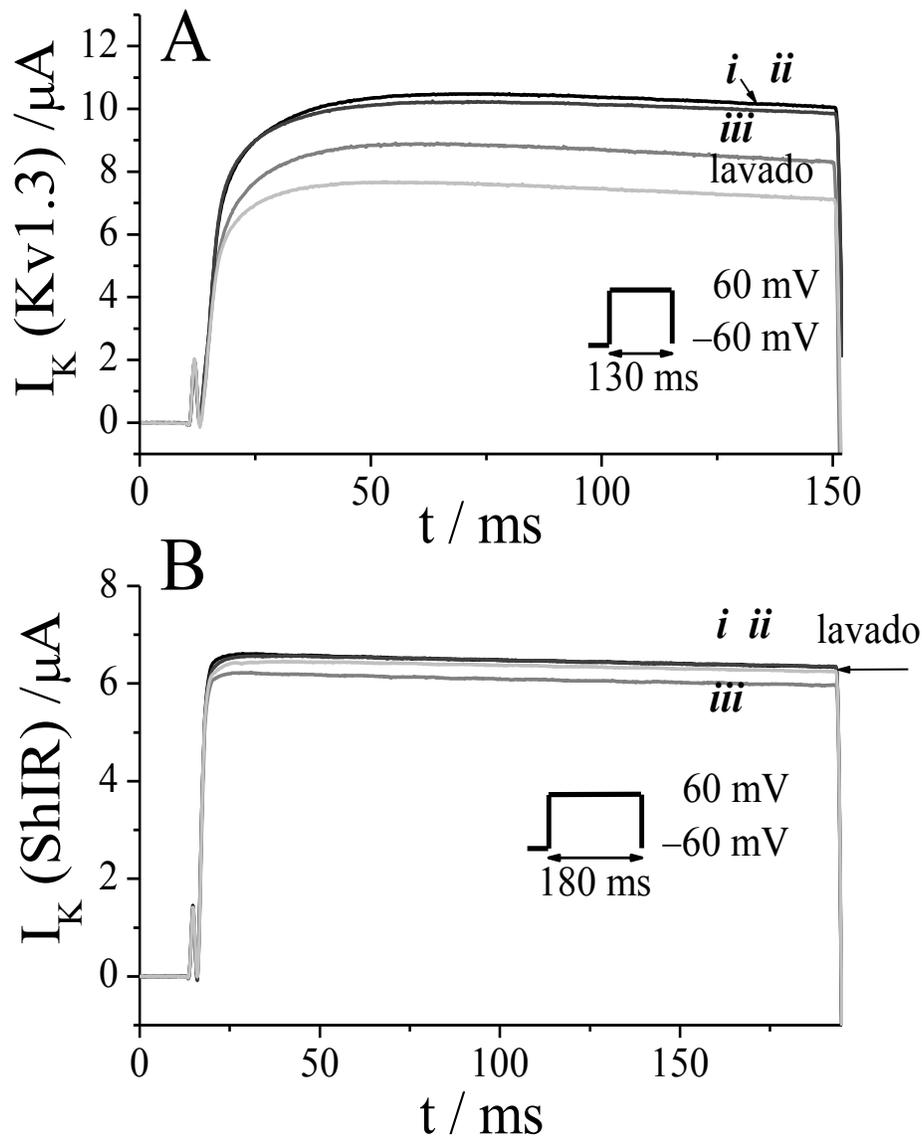


Figura 5.5. Inhibición de las corrientes de $I_K(Kv1.3)$ (A) e $I_K(ShIR)$ (B) después de la adición de 100 μM de NQ. Los trazos se denotaron como (i) control positivo; (ii) adición de 200 mM EtOH y (iii) adición de 100 μM de NQ y después de diversos lavados (lavado). El potencial de mantenimiento empleado fue de -60 mV y el protocolo de pulsos fue -60 a $+60$ mV durante 200 ms.

Diversos autores han demostrado que las quinonas pueden interactuar por la parte extra o intracelular.^{126,127,128,129} A su vez, pueden hacerlo mediante reacciones de oxidación^{130,131} con grupos tioles expuestos en algunas proteínas que al formar productos estables alteran su apertura y/o cierre. En este sentido, los residuos de metionina presentes en rKv1.3 y dShIR podrían ser oxidados¹³² en presencia de NQ. Por otra parte, en caso de que la NQ pueda conservarse en sistemas biológicos, produce efectos tales como la inhibición de la angiogénesis¹³³ y crecimiento de células de cáncer de colon (HCT116). Lo anterior, podría afectar algunas vías de transducción de señales por la interrupción de la función de proteínas o bien por la producción de radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y radicales semiquinona ($Qs^{\cdot-}$) por reacciones con la quinona reductasa.¹³⁴ Ante estos hechos, se hace necesario el intentar establecer el posible mecanismo de inhibición de rKv1.3 en presencia de NQ.

5.1.2. Efecto de la concentración de NQ sobre las I_K de rKv1.3.

Ya que la adición de NQ provoca una disminución más importante de I_K en rKv1.3 que en dShIR, se evaluó la posible relación entre la concentración de NQ y su efecto inhibitorio sólo en este canal. Se realizaron registros electrofisiológicos a diferentes concentraciones de NQ (1 – 500 μ M) y los resultados demostraron que el efecto inhibitorio de I_K es dependiente de la concentración.

126 Salazar, H.; Llorente, I.; Jara-Oseguera, A.; García-Villegas, R.; Munari, M.; Gordon, S.; Islas, L.; Rosenbaum, T. Single N-terminal cysteine in TRPV1 determines activation by pungent compounds from onion and garlic. *Nat. Neurosci* 11 (2008) 255-261.

127 Varga, Z.; Bene, L.; Pieri, C.; Damjanovich, S.; Gáspár, R. The effect of juglone on the membrane potential and whole-cell K^+ currents of human lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 218 (1996) 828–832.

128 Palmeira, C.; Wallace, K. Benzoquinone inhibits the voltage-dependent induction of the mitochondrial permeability transition caused by redox-cycling naphthoquinones. *Tox. Appl. Pharm.* 143 (1997) 338-347.

129 Kikuno, S.; Taguchib, K.; Iwamoto, N.; Yamanoc, S.; Chod, A.; Froinesd, J.; Kumagaib, Y. 1,2-Naphthoquinone activates vanilloid receptor 1 through increased protein tyrosine phosphorylation, leading to contraction of guinea pig trachea. *Tox. and Appl. Pharm.* 210 (2006) 47 – 54.

130 Feng, W.; Liu, G.; Xia, R.; Abramson, J.; Pessah, I. Site-selective modification of hyperreactive cysteines of ryanodine receptor complex by quinones. *Mol. Pharmacol.* 55 (1999) 821-831.

131 Petronilli, V.; Constantini, P.; Scorrano, L.; Colonna, R.; Passamonti, S.; Bernardi, P. The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols. *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 16638-16642.

132 Vogt, W. Oxidation of methionyl residues in proteins; tools, targets and reversal. *Free Rad. Biol. & Med.* 18 (1995) 93–105.

133 Kayashima, T.; Mori, M.; Yoshida, H.; Mizushima, Y.; Matsubara, K.; 1,4-Naphthoquinone is a potent inhibitor of human cancer cell growth and angiogenesis. *Cancer Letters* 278 (2009) 34–40.

134 Schopfer, P.; Heyno, E.; Drepper, F.; Krieger-Liszkay, A. Naphthoquinone-dependent generation of superoxide radicals by quinone reductase isolated from the plasma membrane of soybean. *Plant Physiology* 147 (2008) 864–878.

La curva dosis-respuesta (figura 5.6) se normalizó con la ecuación de Hill modificada¹³⁵ $y=1/[1+(C/K_{1/2})^\eta]$. Donde C es la concentración de NQ, $K_{1/2}$, es la concentración donde ocurre la mitad de la máxima inhibición y η es el coeficiente de Hill. Los resultados arrojaron un valor de IC_{50} de $92.8 \pm 11.7 \mu\text{M}$ con un coeficiente de Hill de 0.53. Este valor, es un indicativo de cooperatividad negativa es decir que quizás no hay gran afinidad entre la NQ y la proteína, pero que por lo menos una molécula de NQ interacciona con el canal. El hecho de que en la curva dosis-respuesta no se alcance la saturación señala que el efecto bloqueador de NQ sobre Kv1.3 es inespecífico. Sin embargo, cabe mencionar que concentraciones mayores de $500 \mu\text{M}$ de NQ no fueron posibles de evaluar ya que este valor es muy cercano al límite de solubilidad de la NQ en H_2O . Asimismo, se observó en algunos ensayos que esta misma concentración provocaba daño en la membrana de los ovocitos.

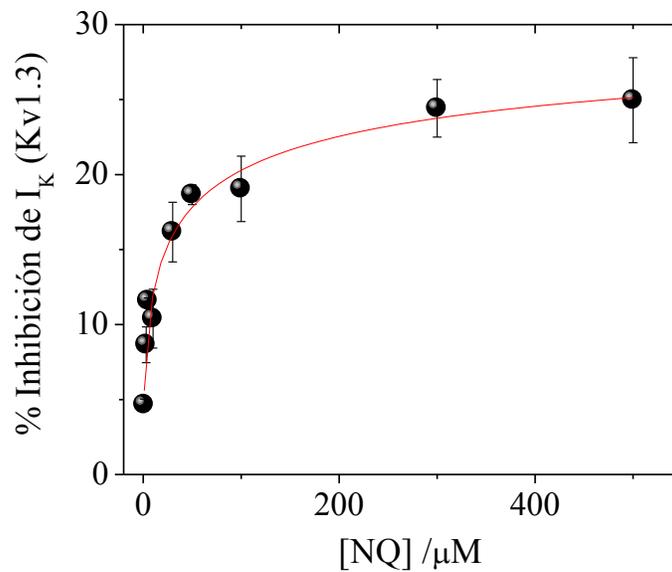


Figura 5.6. Evaluación del porcentaje (%) de inhibición de las corrientes de rKv1.3 en función de la concentración de NQ.

135 Czirjak, G.; Enyedi, P. Task-3 dominates the background potassium conductance in rat adrenal glomerulosa cells. *Mol. Endocrinology* 16 (2002) 621-629.

5.1.3. Efecto del potencial impuesto NQ sobre las I_K de rKv1.3 y dShIR.

Hasta ahora, los resultados demuestran que la inhibición de las I_K de rKv1.3 en presencia de NQ ocurre de manera irreversible, dependiente de su concentración y quizás de forma inespecífica, pero a través de un tipo de interacción más importante que la que ocurre con dShIR. En un intento de establecer el mecanismo de inhibición de rKv1.3 se evaluó el efecto de la adición de NQ a diferentes potenciales del pulso aplicado (figura 5.7).

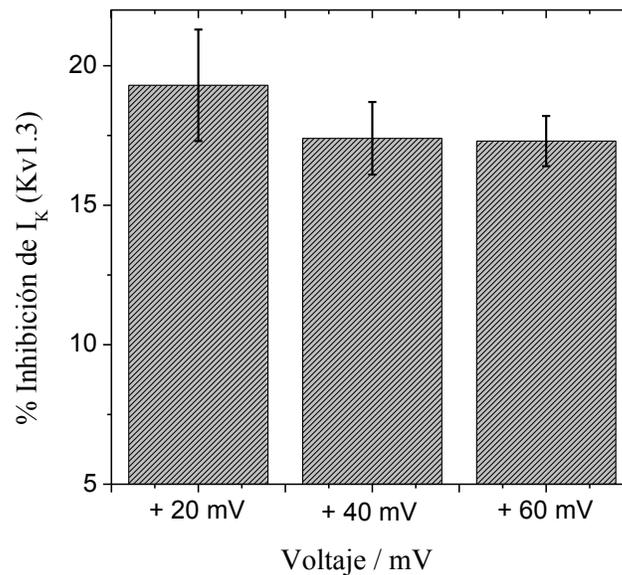


Figura 5.7. Evaluación del porcentaje (%) de inhibición de I_K (Kv1.3) después de la adición de 100 μ M de NQ en función del potencial de pulso aplicado. El potencial de mantenimiento utilizado para la obtención de las corrientes fue de -60 mV y el protocolo de pulsos fue -60 a 0, +20, +40 y +60 mV durante 200 ms respectivamente.

Los resultados sugieren que la inhibición de rKv1.3 en presencia de 100 μ M de NQ ocurre de manera independiente del potencial impuesto 19.3±2.0, 17.4±1.3 y 17.3±0.9 para +20, +40 y +60 mV respectivamente. Para el análisis, sólo estos valores de potencial se consideraron ya que a potenciales menos despolarizados la probabilidad de apertura de los canales es cercana a cero y prácticamente no se encuentra abierto. El hecho de que la inhibición de I_K (rKv1.3) no presente una dependencia con el potencial aplicado es un indicativo de que la NQ no interacciona directamente con el segmento transmembranal cuatro del canal, S4, que funciona como sensor del voltaje. Entonces, esta interacción debe ocurrir en algunos otros sitios tales como otros segmentos transmembranales (S), asas intra

y extracelulares (A) o poro (P). Más adelante en este trabajo, se intentará elucidar el posible mecanismo de interacción de NQ con rKv1.3.

5.1.4. Efecto de compuestos redox sobre las I_K de rKv1.3.

Los resultados demostraron que la interacción de la NQ con el rKv1.3 es importante, irreversible e independiente del pulso de potencial aplicado. Algunos autores han informado que las quinonas juegan un rol importante en la generación de radicales libres en las células como una consecuencia de sus propiedades redox.^{136,137} Esto, hace suponer que la inhibición de rKv1.3 ocurre mediante una interacción del tipo redox entre la NQ y el canal. Dada la naturaleza oxidante de la NQ y en un intento de verificar lo anterior, se evaluaron las corrientes de rKv1.3 frente a especies de naturaleza oxidante y reductora (I_{redox}) incluyendo a NQ. Para ello, los ovocitos se expusieron a los agentes oxidantes más comúnmente utilizados en biología tales como H_2O_2 y GSSG.^{10,138} Así mismo, se realizaron ensayos utilizando GSH, 2SEtOH, ditionita y DTNB como agentes reductores. Todos los compuestos se evaluaron a una concentración de 100 μM . Para el análisis se monitoreó el curso temporal de las corrientes medidas a los 80 ms de cada pulso repetitivo de potencial de 330 ms a +60 mV. Los datos se normalizaron mediante la relación $I_{\text{redox}}/I_{\text{control}}$ (figura 5.8). Cabe mencionar que la disolución de lavado (ND 96) no contenía agentes reductores ni oxidantes que pudieran revertir los efectos de los compuestos a evaluar.

En la figura 5.8 se presenta el efecto que producen: la adición y el lavado (señalados con una flecha hacia abajo y hacia arriba, respectivamente) de los agentes oxidantes y reductores; además, se incluye la adición consecutiva de NQ para evaluar su posible efecto oxidante en el medio de trabajo.

136Brunmark, A. ; Cadena, E. Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications. *Free Rad. Biol. and Med.* 7 (1989) 435-477.

137Begleiter, A.; Blair, G. Quinone induces DNA damage and its relationship to antitumor activity in L5178Y lymphoblast. *Cancer Res.* 44 (1984) 78-82.

138Balog, E.; Lockamy, E.; Thomas, D.; Ferrington, D. Site specific methionine oxidation initiates calmodulin degradation by the 20S proteasome. *Biochem.* 48 (2009) 3005-3016.

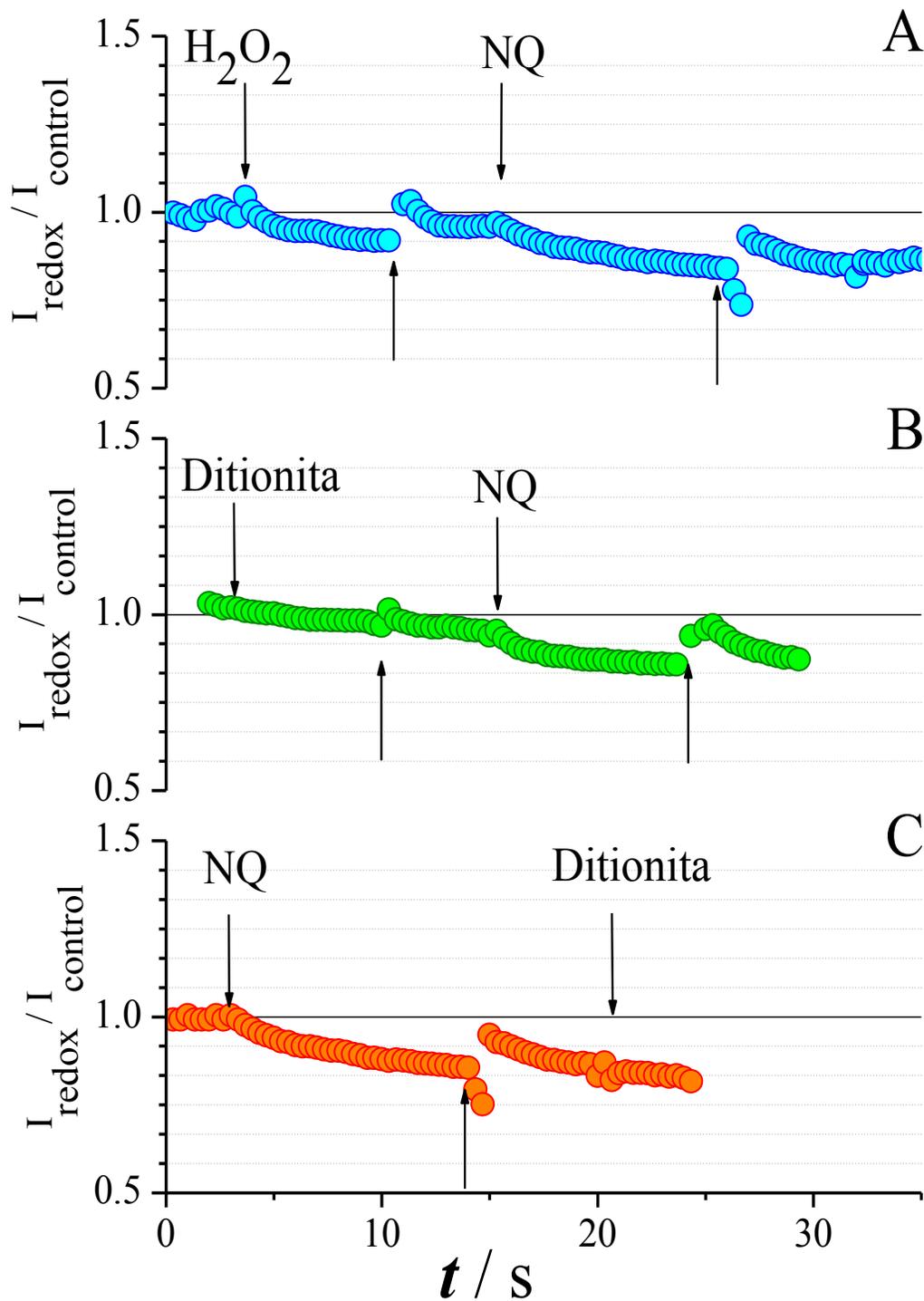


Figura 5.8. Evaluación del efecto de compuestos redox sobre las corrientes de rKv1.3, I_{redox} . Curso temporal de I_{K} (rKv1.3) después de la adición $100 \mu\text{M}$ de (A) H_2O_2 , y (B) Ditionita seguidas de la inhibición con NQ y (C) después de la adición de $100 \mu\text{M}$ de NQ seguida de Ditionita. Los círculos representan las corrientes medidas al final de los pulsos (80 ms) de +60 mV aplicados cada 330 ms. Las adiciones se denotan con flechas hacia abajo (\downarrow), mientras que los lavados con flechas hacia arriba (\uparrow).

Con la adición de H_2O_2 (figura 5.8A) se observó una pequeña inhibición de las corrientes de rKv1.3 que se recuperan después del lavado. Después al agregar NQ la inhibición es mayor que con H_2O_2 y no se recupera con el lavado como ya se había observado. Lo anterior indica que la interacción NQ–canal es más importante y por lo tanto menos reversible que la H_2O_2 –canal a pesar de que ambos son oxidantes. Por otro lado, se observó que la adición de otro oxidante como GSSG produce un daño visible sobre la membrana (agujeros) que provoca el aumento considerable de las corrientes de fuga (los resultados no se muestran). Los resultados proponen que el poder oxidante es un factor importante para la interacción de NQ–canal; sin embargo, el hecho de que la inhibición con NQ sea irreversible sugiere que la estructura de NQ puede ser la diferencia.

En el caso de los compuestos reductores, se demostró que la ditionita de sodio no inhibe las corrientes de rKv1.3 (figura 5.8B) mientras que el efecto por la adición de NQ se comprueba en el mismo ensayo. Otros agentes reductores como el GSH, 2SEtOH y DTNB fueron igual de invasivos que el GSSG para la membrana de los ovocitos, provocando agujeros en ésta. Como la inhibición de rKv1.3 parece estar relacionada con la naturaleza oxidante de NQ y H_2O_2 finalmente se intentó revertir su efecto y se agregó ditionita (figura 5.8C). Los resultados demostraron que la inhibición de rKv1.3 continúa aún después de añadir el agente reductor. Lo mismo se observa aún cuando no se realiza el lavado previo a la adición de ditionita (figura 5.9). Entonces, la falta de recuperación de las corrientes en los ensayos arriba expuestos demuestra que la interacción química NQ–canal es importante, tanto, que la presencia de un agente reductor como la ditionita no es capaz de eliminarla. Lo anterior, es un indicativo de que la inhibición de rKv1.3 no sólo está controlada por la naturaleza oxidante de los compuestos ($E_{H_2O_2/H_2O}$: -1.7 V, E_{pa}^{DT} : 0.06 y E_{pc}^{DT} -0.9 V vs Fc^+/Fc) sino que podría tener un componente estructural de la quinona que hace la diferencia.

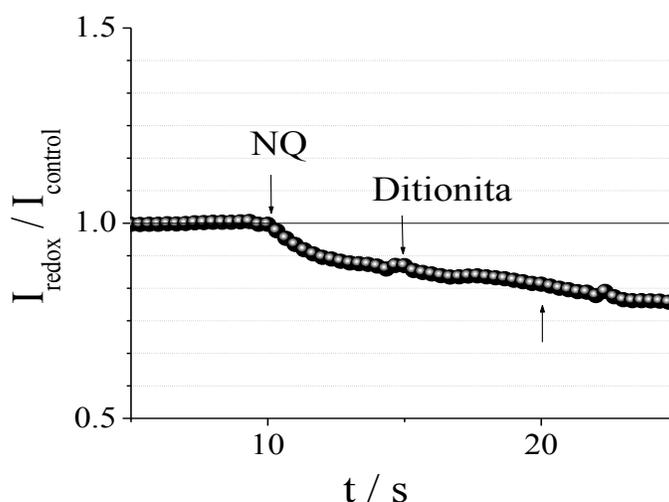


Figura 5.9. Gráfico de $I=f(t)$ del curso temporal de I_K (rKv1.3) después de la adición 100 μM de NQ y ditionita sin lavados previos. Los círculos representan las corrientes medidas al final de los pulsos (80 ms) de +60 mV aplicados cada 330 ms. Las adiciones se denotan con flechas hacia abajo (\downarrow), mientras que los lavados con flechas hacia arriba (\uparrow).

Los EF hasta ahora demuestran que la NQ interacciona de manera importante con rKv1.3 ya que inhibe las I_K de forma irreversible y dependiente de su concentración. A su vez, sugieren que no sólo la naturaleza oxidante de la NQ es responsable de la interacción NQ-canal, si no que su estructura (quinona) es un factor aún más significativo. Por otra parte, los EQ en DMSO (medio hidrofóbico) y en ND 96 (medio hidrofílico), revelaron que los efectos estructurales son importantes ya que modifican las propiedades redox de las NQ. Entonces, puede suponerse que naturaleza redox y efectos estructurales (provocados por diferentes sustituyentes) están relacionados íntimamente con la inhibición de rKv1.3. Dado que el reto de este estudio es determinar la posible relación entre las propiedades estructurales de NQ, su potencial redox y la modulación de las corrientes de los canales iónicos de potasio (rKv1.3 y dShIR), se realizaron EF por TEVC con 100 μM de NQ, 2NH₂NQ y 5OHNQ. Se evaluó el efecto que producen estos compuestos y los resultados se compararon con los EQ.

5.1.5. Comparación de ensayos EF y EQ con NQs.

Los resultados demuestran que las I_K (rKv1.3) se inhiben en presencia de NQs de manera dependiente de su potencial redox (véase la escala de potenciales redox en la parte

superior de figura 5.10). En rKv1.3, el mayor efecto inhibitorio ocurre después de la adición del compuesto más oxidante (5OHNQ); mientras que, el efecto disminuye significativamente con la adición del menos oxidante (2NH₂NQ). Entonces, se puede establecer que el efecto inhibitorio sobre rKv1.3 se incrementa con el poder oxidante de NQs (figura 5.10A). Por otra parte, en dShIR se observó ligeramente el efecto contrario, la menor inhibición se obtuvo después de la adición de 5OHNQ; es decir, la inhibición de dShIR se incrementa cuando el poder oxidante disminuye (figura 5.10B). Sin embargo, un estudio estadístico minucioso del efecto en dShIR demostró que estas últimas diferencias no son significativas en términos del análisis de varianzas (Anexo 2).

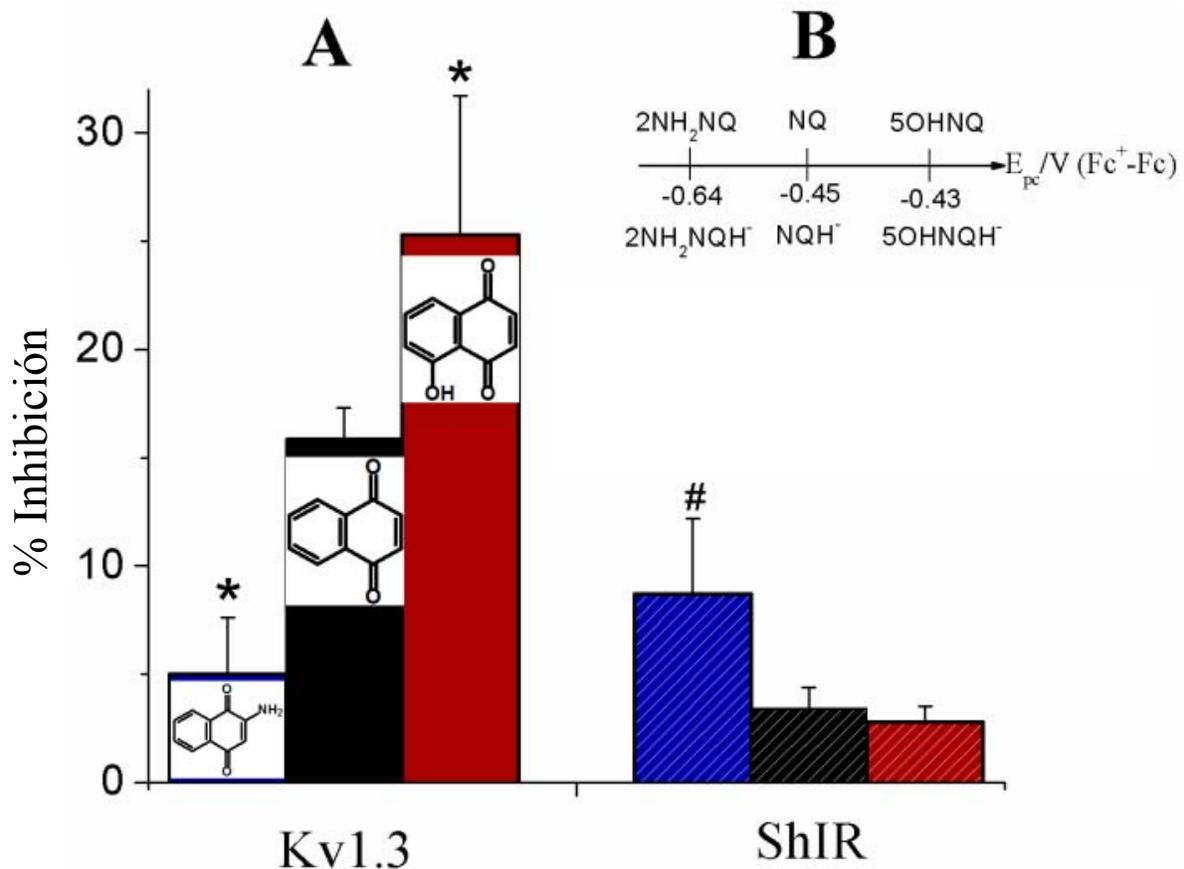


Figura 5.10. Porcentaje de inhibición de las corrientes salientes de potasio de los canales rKv1.3 (A) and dShIR (B) después de la adición de 100 μ M de NQs (NQ, 2NH₂NQ y 5OHNQ). Las corrientes se obtuvieron aplicando un pulso de potencial de +60 mV durante 200 ms partiendo de un potencial de mantenimiento de -60 mV. Los datos se presentan como la media \pm SEM (*, # $p < 0.05$ vs NQ, $n=6$). En la parte superior de la figura se muestra la escala de potenciales de reducción obtenidos en medio ND96 de las NQs.

El hecho de que se observe una dependencia entre el potencial redox de NQs y la inhibición de Kv1.3, sugiere que la interacción de NQ podría estar ocurriendo con una cisteína (C) o metionina (M) de la estructura primaria del canal, ya que éstos aminoácidos (aa) se consideran los sitios redox más reactivos en las proteínas. Algunos autores proponen que la oxidación de C o M puede modificar la actividad de los canales iónicos.^{10,139,140,141}

Los resultados hasta ahora, manifestaron que tanto la naturaleza oxidante como los efectos estructurales en las NQs son factores importantes para la regulación de la inhibición de los canales en estudio. Interesantemente, aunque ambos canales pertenecen a la misma familia (Kv1.x) presentaron comportamientos diferentes frente a NQ. Lo anterior sugiere que la modulación de estos canales en presencia de NQs ocurre de una manera más fina y en sitios específicos de la proteína. Intentando verificar lo anterior, se realizó un análisis comparativo detallado de la secuencia primaria de ambos canales. Principalmente, se enfocó la atención en los sitios de los canales que son vulnerables de oxidarse ya que esto puede tener como consecuencia la disfunción del canal.

5.1.6. Análisis de secuencias primarias de rKv1.3 vs dShIR.

Para el análisis, se emplearon las secuencias primarias de rKv1.3 y dShIR publicadas por Pongs¹⁴² con número de acceso NP_062143.3 y por Aldrich^{143,144} con número de acceso NP_728123.1 en la base NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Posteriormente, se utilizó la herramienta de alineamiento de secuencias del programa en línea SDSC-Biology WorkBench (<http://workbench.sdsc.edu>, versión 3.2). En la figura 5.11 se muestra la comparación de secuencias y el alineamiento de aa de los canales en estudio a partir de la cual se efectuó el análisis. Para el seguimiento de las observaciones realizadas, en la figura se destacan algunos de los posibles sitios de interacción: segmentos S (dentro de cajas negras), asas A extracelulares (denotadas por arriba) e intracelulares (por debajo) entre sus

139 Shechter, Y. Selective oxidation and reduction of methionine residues in peptides and proteins by oxygen exchange between sulfoxide and sulfide. *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 66-70.

140 Wang, Z.; Nara, M.; Wang, Y.; Kotlikoff, M. Redox regulation of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel in smooth muscle cells. *J. Gen. Physiol.* 110 (1997) 35-44.

141 Hepp, S.; Gerich, F.; Müller, M.; Sulfhydryl oxidation reduces hippocampal susceptibility to hypoxia-induced spreading depression by activating BK channel. *J. Neurophysiol.* 94 (2005) 1091-1103.

142 Stühmer, W.; Ruppersberg, J.; Schröter, K.; Sakmann, B.; Stocker, M.; Giese, K.; Perschke, A.; Baumann, A.; Pongs, O. Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian, *EMBO J.* 8 (1989) 3235-3244.

143 Hoshi, T.; Zagotta, W.; Aldrich, R. Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation, *Science* 250 (1990) 533-538.

144 Zagotta, W.; Hoshi, T.; Aldrich, R. Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB, *Science* 250 (1990) 568-571.

correspondientes S y el poro P. Los aa idénticos en ambos canales se marcan en negritas, mientras que los similares en letras cursivas. Para una mejor visualización, todos los residuos de **C** y **M** se presentan en cajas negras, mientras que los aa aromáticos en S5-P-S6 y las zonas ricas en serinas y aa ácidos, se presentan subrayados (para nomenclatura de aa véanse abreviaturas). A partir de la comparación de secuencias se encontraron diferencias que pueden explicar los resultados EQ y EF antes descritos, y con ellas se proponen tres hipótesis con base en la interacción más viable de la NQ con los canales rKv1.3 y dShIR.

5.1.6.1. Interacciones hidrofóbicas.

Se encontraron diferencias importantes en el vestíbulo externo del P de rKv1.3 (figura 5.11, sexto renglón, aa subrayados en negro). Aquí, se encuentran presentes dos glicinas (**G**); mientras que en dShIR en la misma posición, hay dos residuos aromáticos fenilalanina (**F**) y triptófano (**W**). Debido a la estructura de la NQ (dos anillos aromáticos fusionados), ésta puede intercalarse fácilmente entre los residuos de **F** y **W** mediante interacciones tipo π -apilamientos. Este tipo de interacciones, impedirían que la NQ llegue a su sitio de acción y es por ello que el efecto inhibitorio sobre dShIR no es significativo en comparación con el efecto en rKv1.3. Adicionalmente, el análisis de las secuencias demostró que en otros sitios extracelulares de dShIR, están presentes aa aromáticos cercanos seguramente más externos a la membrana (véase A1 en figura 5.11, tercer renglón, aa subrayados en azul) que hacen importante el efecto antes descrito. Lo anterior, explica el hecho de que la NQ inhibe significativamente las corrientes de rKv1.3 (efecto que se observa en los ensayos EF, véase figura 5.5), mientras que lo contrario se observa con dShIR. Los efectos redox se explican más adelante.

Primera hipótesis: Si se intercala la NQ entre los aa aromáticos de las proteínas, entonces su efecto disminuye ya que los π -apilamientos impiden su llegada al sitio de interacción.

5.1.6.2. Interacción con Metionina.

En el asa extracelular A3 de ambos canales está presente una metionina, **M308** y **M356**, para rKv1.3 y dShIR respectivamente (véase A3 en figura 5.11, quinto renglón, metionina **M** en caja negra). En el caso de dShIR, el A3 que contiene a la **M356** (A3, **M356**) está constituido por 28 aa mientras que en rKv1.3 la misma asa posee sólo 14 aa (A3, **M308**). Entonces, en rKv1.3 la **M** podría encontrarse más expuesta y por lo tanto fácilmente disponible para su oxidación por la NQ y por consecuencia, se observaría mayor

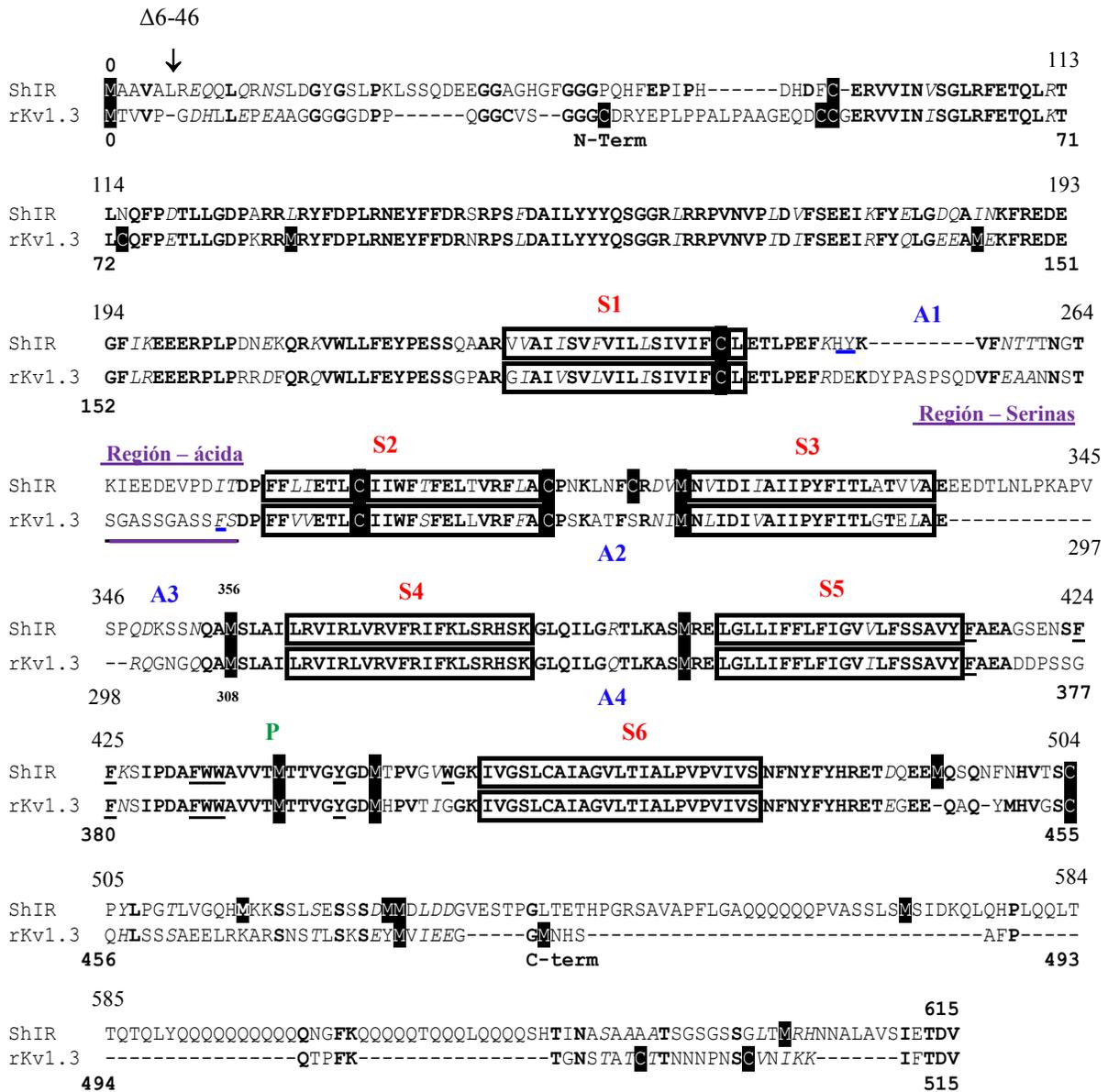


Figura 5.11. Alineamiento de las secuencias de aa de los canales rKv1.3 y dShIR. La secuencia de dShIR es más corta por 41 aa debido a la delección (Δ6-46) del dominio de inactivación (IR) (↓). Posibles sitios de interacción con agentes oxidantes, residuos de cisteína (C) y metionina (M) denotados en cajas negras. aa idénticos se muestran en negritas, mientras que aa similares en itálicas. Los segmentos transmembranales (S) se encuentran enmarcados y las asas (A) extracelulares e intracelulares se denotan por arriba y por debajo respectivamente entre sus correspondientes segmentos. Los aa aromáticos en S5-P-S6, la zona rica en serinas (Región-Serinas) y en residuos ácidos (Región-ácida) se presentan subrayados. El poro (P) se indica por encima de su secuencia.

inhibición. Mientras que en dShIR, la misma **M** se exhibe menos por lo que su oxidación sería poco probable¹³² y por tanto, su inhibición debería ser menor. Lo anterior, explica las diferencias observadas en los ensayos EF con los canales en estudio, así como su relación con la naturaleza oxidante de los compuestos NQ y H₂O₂ ya que ambos inhiben a rKv1.3.

*Segunda hipótesis: Si la inhibición de los canales en estudio es resultado de la oxidación de la **M** en A3 por la NQ entonces, ambas se favorecen si esta **M** se encuentra más expuesta.*

5.1.6.3. Interacciones vía Puentes de hidrógeno.

Al final del asa extracelular A1 en dShIR se observa una zona rica en aa ácidos como glutámico, **E**, y aspártico, **D**, (identificadas como Región-ácida=EEDExxDxxD en la figura 5.11, cuarto renglón, donde x se refiere a cualquier otro aminoácido). A pH fisiológico, los aa **E** y **D** se encuentran desprotonados (pka 4.0 y 4.3 respectivamente) por lo que generan un ambiente polar cargado negativamente en ese sitio específico de la proteína. Ahí, la NQ puede presentar cierta repulsión electrostática debido a su estructura aromática, evitando así su focalización en el sitio de interacción (**M356**). Por otra parte, la misma zona en rKv1.3 es rica en serinas (denotada como Región-serinas=SxSxxSSxxSSxS en figura 5.11, tercer renglón). Estos grupos hidroxilos, generan un ambiente más hidrofílico (no cargado) que facilitaría la reducción de NQ, tal como se observó en los ensayos EQ en ND 96. En este mismo sitio, la NQ también puede estabilizarse mediante puentes de hidrógeno con las serinas, aumentando así su permanencia y posibilidad de interacción con **M308** para inhibir el canal. Lo anterior, explica lo observado en los ensayos EF con NQs y la relación establecida con el potencial redox de las mismas. Los resultados EQ y EF explican los efectos estructurales de la NQ y su papel en la inhibición irreversible de las corrientes de rKv1.3.

Tercera hipótesis: Si la reducción y estabilización de NQ se favorecen en ambientes hidrofílicos, y a su vez son ayudados por interacciones vía puentes de hidrógeno, entonces la presencia de serinas cerca de la metionina en A3 facilitaría su oxidación dando como resultado la inhibición del canal.

Las hipótesis planteadas, explican las diferencias observadas en los ensayos EF, la inhibición irreversible de rKv1.3 y la relación con el potencial redox de NQs. A su vez, ponen de manifiesto los efectos estructurales sobre la naturaleza redox de los NQs y las diferencias en el mecanismo de reducción a partir de los ensayos EQ.

Sin embargo, en un intento de confirmar las propuestas planteadas con base en los ensayos EQ, EF y el análisis de las secuencias primarias de rKv1.3 y dShIR, se realizó un estudio de docking para verificar los sitios específicos y posibles interacciones NQ-canal.

CAPÍTULO 6

ESTUDIOS DE MODELADO MOLECULAR

El docking puede definirse como una operación basada en la energía que explora los modos de unión de dos moléculas. Predice la orientación y sitio de unión preferido de un ligante cuando se une a una proteína para formar un complejo estable, ayudando así a establecer su afinidad y por tanto, su actividad. Los estudios de docking incluyen términos que representan el corto alcance de interacciones tales como hidrofóbicas, de dispersión, o de Van der Waals, interacciones electrostáticas, pérdida de entropía por la unión del ligando, el enlace de hidrógeno y solvatación. Sin duda, los resultados son importantes en el campo de la farmacia, farmacología y bioquímica.

Los estudios de docking, arrojaron información adicional sobre la unión propuesta de NQ con Kv1.3 con base en los resultados experimentales de EQ y EF que a su vez, demostraron que la interacción NQ-canal es dependiente del potencial redox de NQ. Lo anterior, hace suponer que esta interacción podría darse sólo en sitios específicos de los canales en estudio. Así, las herramientas computacionales resultan una atractiva opción para poder comprobar las hipótesis antes planteadas. Adicionalmente, la simulación de los acoplamientos podría proveer evidencia acerca de la naturaleza de las interacciones, así como de los posibles sitios de afinidad permitiendo entender las consecuencias de dichas interacciones. Con base en lo anterior, el estudio de modelado molecular se realizó en orden de conocer las interacciones específicas que ocurren en la formación de los complejos ligante-proteína $L-P$ y se compararon con los resultados obtenidos mediante experimentos EF y EQ.

6.1. DISCUSIÓN DE RESULTADOS DE ESTUDIOS POR DOCKING

Para una mejor comprensión de las imágenes, la identificación de los aa que se discuten a continuación se realizó utilizando la nomenclatura trivial (de tres letras) y sólo en el caso de comparación de secuencias primarias (anexo 3) se empleó la nomenclatura abreviada de una letra.

6.1.1. Modelado por Homología.

Intentando respaldar los efectos observados en los ensayos experimentales (EQ y EF), se realizaron estudios de modelado molecular con el fin de verificar los acoplamientos L-P y los sitios específicos de interacción entre la NQ y los canales en estudio. Para ello, primero se compararon las secuencias reportadas por Pongs⁷⁵, Aldrich⁷⁶ y Grissmer⁷⁹ con las encontradas en NCBI (véase Anexo 3, figuras A3.1, A3.2 y A3. 3). A través de un análisis por BLAST en línea se encontraron dos moldes o plantillas para comenzar el modelado, 2r9rB y 3lutB y con ambos, se construyeron los monómeros 3D de los canales rKv1.3, dShIR y hKv1.3 empleando los programas en línea i-Tasser y Swiss Model (véase Anexo 3, figuras A3.4 y A3.5). Los modelos generados por Swiss Model fueron seleccionados para llevar a cabo el docking debido a que presentaron los mejores resultados.

En la Figura 6.1 se observa que al comparar los modelos de rKv1.3 y hKv1.3 independientemente del molde utilizado, se conserva la identidad y la conformación espacial de los S (α -hélices). No obstante, en el asa extracelular A1 se aprecian pequeños cambios de orientación espacial (véase zoom en figura 6.1, indicados con flechas). Se demostró que en A1 hay 6 modificaciones de aa (anexo 3, figura A3.3) aarKv1.3-aahKv1.3: P219-T269, V223-S273, N228-G278, A234-S284, S235-R285 y S236-A286; sin embargo, éstas no parecen provocar cambios significativos en la estructura 3D de éstas proteínas. Al comparar los modelos de rKv1.3 y hKv1.3 obtenidos con los moldes 2r9rB y 3lutB (rKv1.3_2r9rB, rKv1.3_3lutB, hKv1.3_2r9rB y hKv1.3_3lutB en la figura 6.1) se observa que A1 se modifica sustancialmente dependiendo del molde utilizado

pasando de un lazo corto a uno largo. Lo anterior es de importancia ya que una de las hipótesis propuestas involucra esta estructura del canal. Como ya se mencionó, en A1 de rKv1.3 (y hKv1.3) hay una zona rica en serinas (figura 5.11) que favorece la interacción NQ–canal. Si estas serinas se encuentran muy separadas entre sí como en el monómero obtenido con 3lutB, las interacciones planteadas no tendrán un efecto tan importante como en una estructura compacta como el lazo corto obtenido con 2r9rB. Finalmente se observa que el A3 extracelular no se modificó en forma pero sí en su orientación espacial al cambiar de molde. Es importante destacar que con 2r9rB el A1 y A3 quedan paralelas, mientras que con 3lutB se encuentran prácticamente perpendiculares donde el efecto de las serinas podría disminuir. Cabe recordar que el A3 es importante ya que ahí se encuentra la metionina de interés (Met308 y Met358, en rKv1.3 y hKv1.3 respectivamente).

Con base en estas observaciones se realizaron los estudios de acoplamiento con ambas estructuras (rata y humano) y empleando los dos moldes (2r9rB y 3lutB). Ya que estructuralmente no se encontraron diferencias significativas entre rKv1.3 y hKv1.3, a partir de este momento y en este trabajo se denotarán como Kv1.3 indistintamente y únicamente en caso necesario, se mencionaran particularmente.

En la Figura 6.2 se muestra la comparación de monómeros de dShIR adquiridos con 2r9rB y 3lutB (dShIR_2r9rB y dShIR_3lutB). Se observa que la conformación espacial de los S se conserva, mientras que A1 y A3 modifican su representación y orientación. De la misma forma que en Kv1.3, en dShIR_2r9rB el A1 se presenta como un lazo corto que cambia a uno largo cuando es generado con 3lutB. Ya se había mencionado que en A1, hay una zona rica en aa ácidos (figura 5.11) que a pH fisiológico generan un ambiente polar cargado negativo. Este, podría repeler electrostáticamente a la NQ provocando que al no llegar a su sitio de acción, su actividad se vea disminuida o hasta anulada. Entonces, en el lazo corto estos efectos pueden ser más significativos por estar más juntos estos aa, mientras que en el largo al estar más dispersos el efecto sería poco importante. Por otra parte, el A3 se modifica drásticamente en forma y orientación pasando de una hoja β -plegada a un lazo largo en cuyo extremo permanece la metionina de interés (Met356).

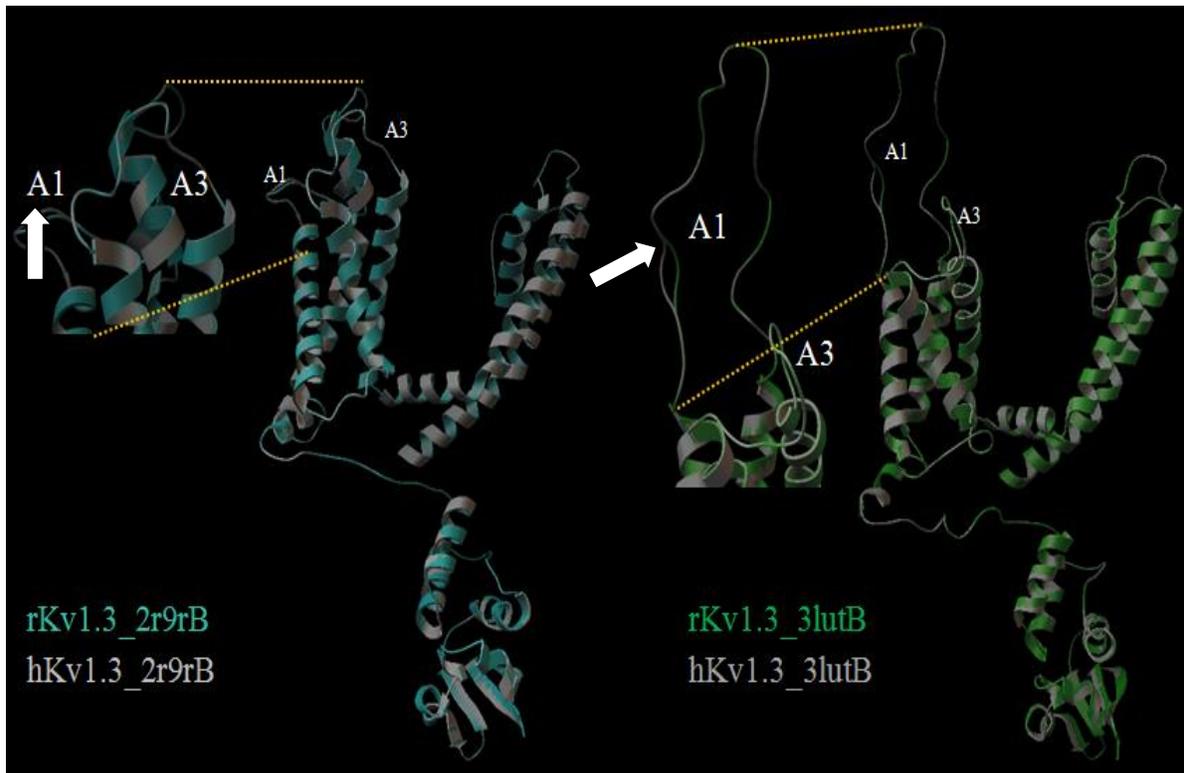


Figura 6.1. Comparación de monómeros de rKv1.3 (tonos verde) y hKv1.3 (gris) obtenidos con los moldes 2r9rB (izq) y 3lutB (der). Las diferencias en A1 y A3 están magnificadas e indicadas con flechas blancas.

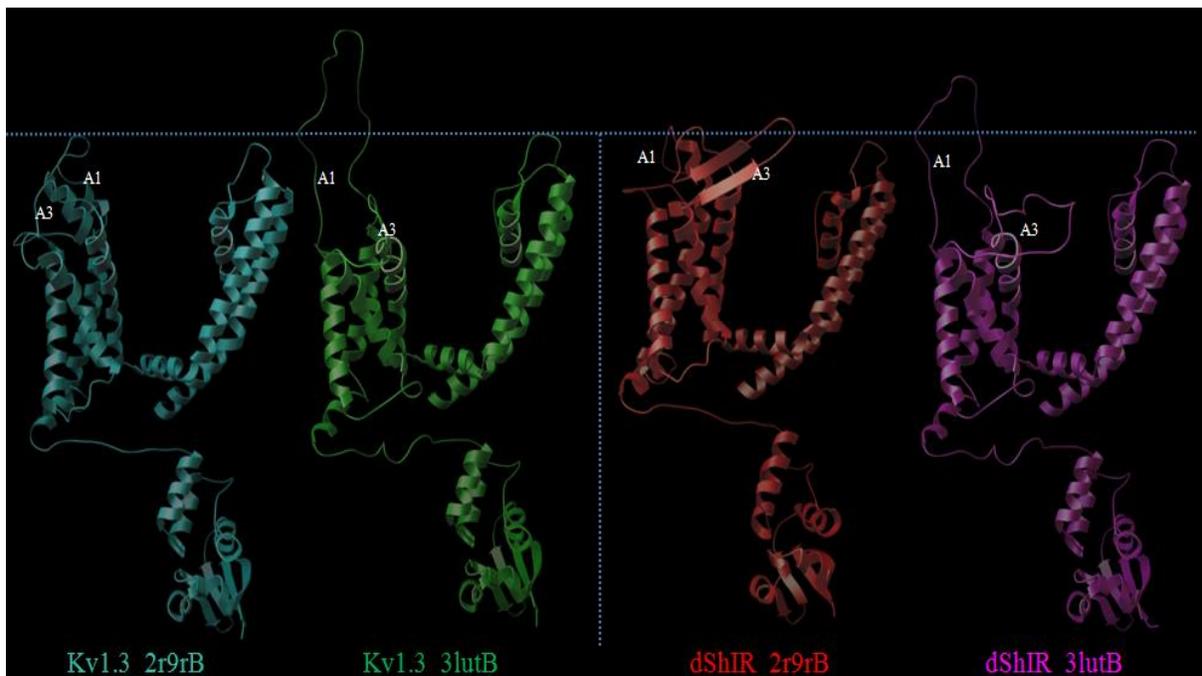


Figura 6.2. Monómeros de Kv1.3 (tonos verdes) en comparación con dShIR (tonos rojos) utilizando como molde a 2r9rB (rojo) y 3lutB (rosa). En ambos monómeros se observan diferencias en cuanto a forma y orientación espacial de A1 y A3.

Finalmente, con los monómeros se construyeron los homotetrámeros de Kv1.3 y dShIR con el programa en línea SymmDock. En la figura 6.3 se observa que se conserva la orientación espacial de los S, de A1 y A3 con respecto a sus monómeros. Es importante mencionar que las estructuras corresponden a lo reportado en Uniprot (<http://www.uniprot.org/uniprot/P08510> y P15384 respectivamente). Los modelos obtenidos sugieren que las variaciones en A1 y A3 en ambos canales, podrían ser la diferencia entre mantener disponible o no algún(os) aa responsable(s) de la interacción con NQ observada en los EF.

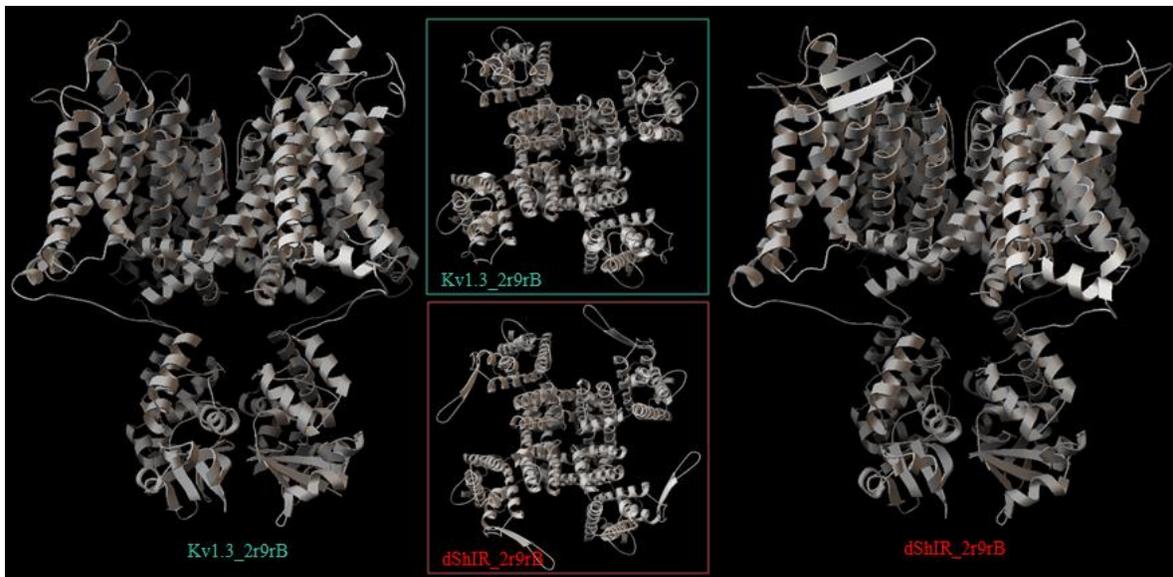


Figura 6.3. Homotetrámeros de Kv1.3 y dShIR generados con SymmDock utilizando como molde a 2r9rB. En una vista lateral (extremos) y superior (centro) de las proteínas se observa la orientación espacial que adopta A1 y A3.

6.1.2. Predicción de sitios de interacción.

Previo al estudio de acoplamiento L-*P*, los monómeros se sometieron a un análisis mediante el programa en línea Q-SiteFinder.¹⁴⁵ Este programa, predice de forma aproximada las cavidades en *P* que son favorables para la interacción con L independientemente de su naturaleza y estructura. Las cavidades en *P* son representadas en

145 Laurie, A. T.; Jackson, R. M.; Q-SiteFinder: an Energy-based method for the prediction of protein-ligand sites. *Bioinformatics* 21 (2005), 1908-1916.

forma de espacios y las identifica mediante un código de colores que van desde el turquesa→azul→morado→naranja→café de acuerdo con su energía de unión, siendo el más propicio el de color turquesa. No obstante, este análisis no considera la naturaleza química del L y por lo tanto, las interacciones y el cálculo del potencial de unión no es preciso. El análisis identificó hasta 10 posibles cavidades en los monómeros de los canales y se muestran en la figura 6.4.

En Kv1.3 se encontraron 3 posibles cavidades de interacción por la parte extracelular del monómero independientemente del molde utilizado. La interacción más conveniente (turquesa) ocurre cerca del A3 donde está la Met308 y Met358. Se identificaron otras cavidades por la parte intracelular del monómero que son menos favorables (coloración azul, violeta y naranja) que las extracelulares. Por otra parte, en dShIR sólo se identificaron 2 cavidades extracelulares localizadas cerca de A1 (figura 6.4). Sin embargo, sólo la identificada en dShIR_2r9rB es adecuada (turquesa). Al parecer, en dShIR_3lutB están más beneficiadas las interacciones en la parte intracelular profunda del monómero. Los ensayos EF sugieren que la interacción NQ-canal ocurre por la parte extracelular de la proteína y que la entrada de NQ al interior del canal no está favorecida. Con base en el análisis por Q-SiteFinder y en los resultados por TEVC que demuestran que no hay una interacción importante de NQ con dShIR, el estudio de acoplamiento con dShIR se realizó únicamente con el modelo generado con 2r9rB.

El volumen de la cavidad turquesa fue de 330 y 264 Å³ cúbicos para Kv1.3 y dShIR respectivamente. A partir de estos valores se puede concluir que en Kv1.3 existe alta probabilidad de interacción L-P en comparación con dShIR, ya que en esa cavidad la NQ tendría mayor libertad conformacional. Los tetrámeros no se analizaron con este programa debido a que el programa sólo acepta modelos con menos de 10,000 átomos.

Finalmente, se emplearon los monómeros de rKv1.3 y hKv1.3 obtenidos con 2r9rB y 3lutB y dShIR_2r9rB para evaluar el acoplamiento con NQ, 5OHNQ y 2NH₂NQ. Debido a que en este trabajo la NQ ha sido considerada como núcleo base, primero se realizó su estudio de acoplamiento de forma detallada y al final, se compararon los resultados con los otros L.

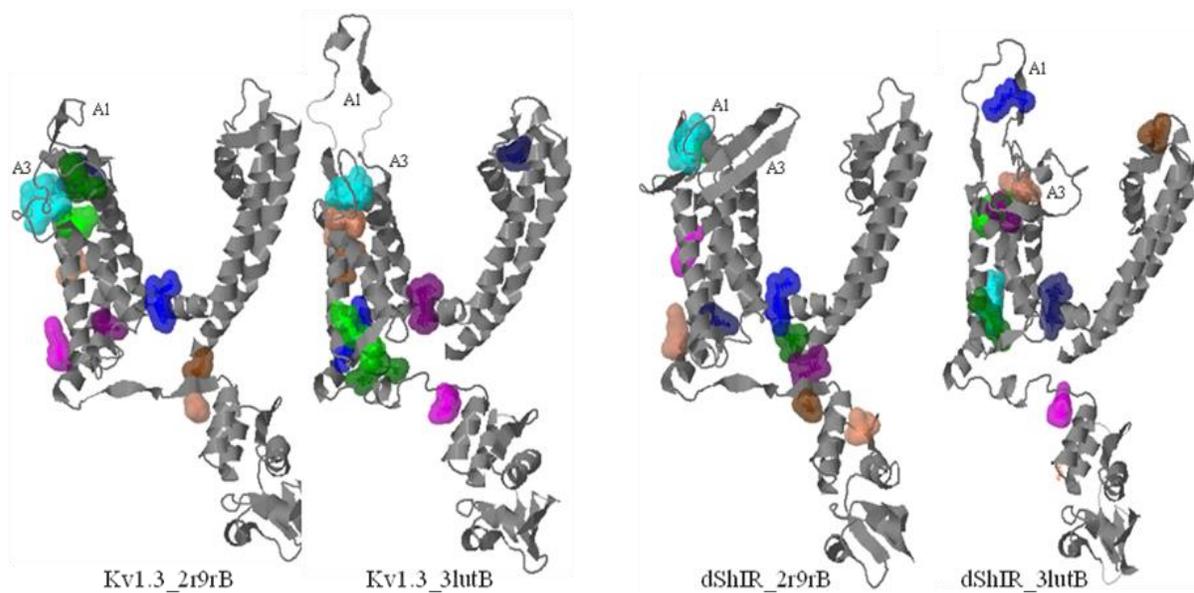


Figura 6.4. Predicción de cavidades por Q-SiteFinder en monómeros de Kv1.3 y dShIR modelados con 2r9rB y 3lutB. Las cavidades de interacción se muestran en colores que van desde turquesa→verde→azul→morado→naranja→café dependiendo de su potencial de unión, siendo es el más favorable el turquesa.

Para el estudio de acoplamiento se utilizó un GRID de $126 \times 126 \times 126 \text{ \AA}$ intentando abarcar la parte intracelular y extracelular del monómero, aunque funcionalmente muchos de estos sitios queden poco disponibles para la NQ por la bicapa lipídica de la membrana celular. El reconocimiento *L-P* se realizó con un espaciado de 0.375 \AA para no perder resolución del estudio. Para el análisis se consideraron las 100 mejores interacciones *L-P* y en la figura 6.5 se representan los conformeros de NQ en forma de líneas sobre el sitio donde ocurre el acoplamiento.

Se identificaron de 25-30 y 15 sitios de interacción de NQ con Kv1.3 y dShIR respectivamente. Aparentemente, estos no se encuentran focalizados en una zona particular del monómero y únicamente hasta cuatro se ubican en la parte extracelular. Esto sugiere que la interacción NQ-canal podría estar favorecida por la parte intracelular de *P*; no obstante, el análisis detallado de los conformeros y sitios de interacción (tabla 6.1) demostró que el 85 y 65 % de los acoplamientos *L-P* ocurren por la parte externa de Kv1.3 y dShIR respectivamente. Cabe recordar que el análisis de cavidades demostró que la más adecuada para que *L* interactúe con *P* está en la parte externa de los canales.

Los resultados hasta ahora, proponen que la interacción con NQ esta favorecida por la parte extracelular de los canales a pesar de los escasos sitios extracelulares en *P* en donde ésta puede ocurrir. El mismo efecto se observa para los otros L en estudio (véase más adelante). A su vez, hay que destacar que los ensayos EF apuntan a que la interacción NQ–canal ocurre por la parte extracelular tal como lo predice el estudio de docking. Finalmente, los valores de energía de acoplamiento (ΔG) demuestran que los conformeros L-*P* más estables se forman por la parte extracelular y que la interacción NQ–Kv1.3 definitivamente es más importante en comparación con dShIR, tal como se observó en los ensayos EF. Resultados similares se encontraron con los tetrámeros de Kv1.3 (véase Anexo 3, figura A3.6).

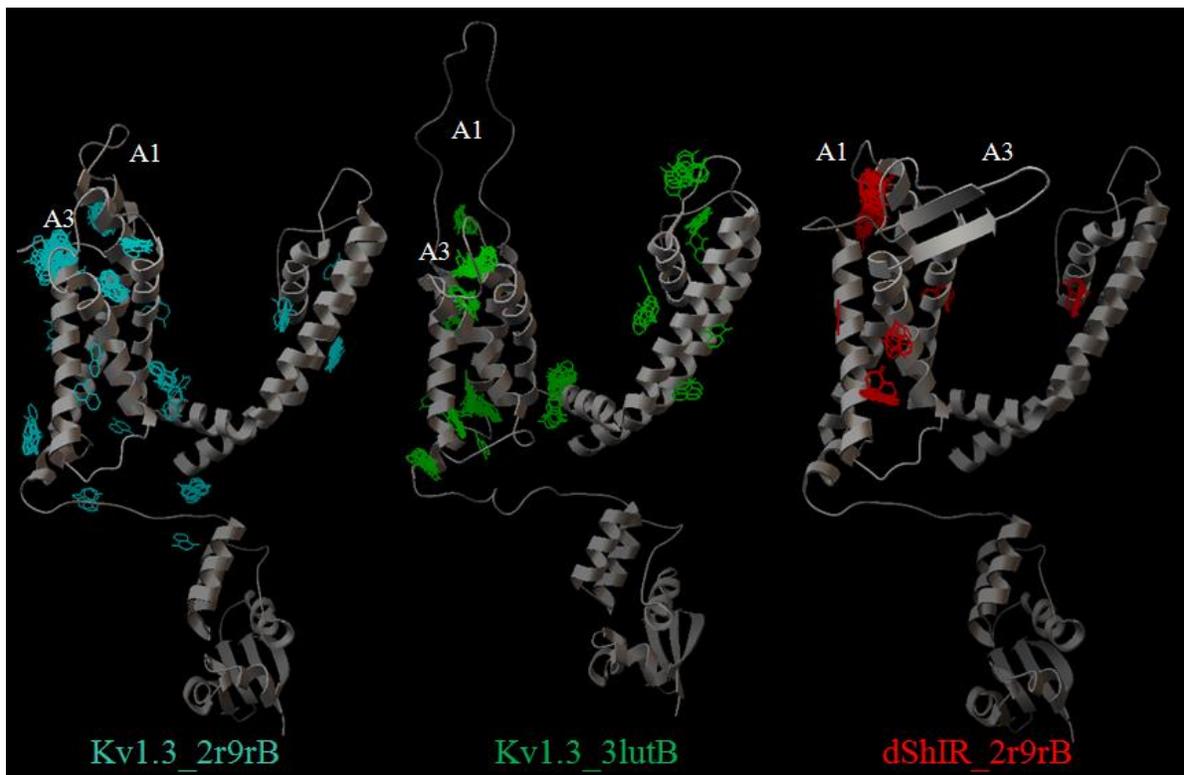


Figura 6.5. Comparación de los 100 mejores acoplamientos NQ–canal considerando una desviación estándar de 0.5Å. Los conformeros se representan en forma de líneas sobre el sitio de interacción. Los monómeros de Kv1.3 fueron modelados con 2r9rB (conformeros en aqua) y 3lutB (verde), mientras que dShIR fue modelado con 2r9rB (rojo).

	EF		DOCKING		
	% I	Molde	ΔG	%EX	%IN
rKv1.3	15.88	2r9rB	-5.20	85	15
	15.88	3lutB	-5.95	76	24
hKv1.3		2r9rB	-5.27	85	15
		3lutB	-5.88	84	16
dShIR	3.39	2r9rB	-3.96	65	35

Tabla 6.1. Tabla de comparación de EF y de acoplamiento (DOCKING) de Kv1.3 y dShIR con NQ. Las condiciones experimentales de los ensayos EF utilizadas para calcular %I consultarlas en la figura 5.10; condiciones para DOCKING pueden ser consultadas en este capítulo. ΔG se refiere a la energía de acoplamiento del conformero de mayor afinidad; %EX e %IN, se refieren al porcentaje de conformeros que se forman por la parte extra e intracelular.

6.1.3. Interacciones *in silico* vs actividad *in vivo*.

Hasta ahora, se propone que NQ interacciona más fácilmente por la parte extracelular con Kv1.3 ya que los sitios de interacción se encuentran mayormente disponibles en este canal. El ΔG de acoplamiento L-P demostró que la interacción con Kv1.3 es más importante en comparación con dShIR (tabla 6.1). Lo anterior, justifica la falta de recuperación de las corrientes de Kv1.3 después de la adición de NQ en los EF, en comparación con dShIR donde hay recuperación total de las mismas (véase figura 5.5). Las observaciones sugieren que a pesar de que ambos canales pertenecen a la familia Kv1.x, existen diferencias finas como la disponibilidad de algún(os) aa que modulan la interacción con NQ.

A pesar de que ambos canales pertenecen a la misma familia Kv1.x, los modelos 3D de sus monómeros presentaron diferencias en A3. Particularmente, este sitio es de importancia en este trabajo ya que ahí se encuentra la metionina de interés, Met308, 358 y 356 en rKv1.3, hKv1.3 y dShIR respectivamente. Se ha descrito en la literatura que los principales centros redox de las proteínas son las Cys y Met, ya que son capaces de oxidarse en presencia de otros compuestos y por consecuencia, pueden modificar considerablemente la actividad de

los canales.^{146, 147, 148} La NQ tiene una naturaleza altamente oxidante por lo que fácilmente podría atacar a las Met expuestas en las proteínas, formando su correspondiente sulfóxido inhibiendo así o hasta inactivando la actividad del canal. Con base en lo anterior, se realizó el análisis fino y detallado de las interacciones que presentan los conformeros NQ-canal.

El estudio de acoplamiento arrojó los 100 mejores conformeros y se agruparon de acuerdo al sitio de interacción, los resultados obtenidos para Kv1.3 y dShIR_2r9rB se concentraron en las tablas 6.2-6.3. Resultados similares se obtuvieron con 3lutB y estos se presentan en el anexo3, tablas A3.2-A3.4. Únicamente se presentan las interacciones extracelulares L-P y la figura 6.6 muestra una descripción más detallada de estas tablas.

En la columna 1 de las tablas 6.2-6.3 (figura 6.6 A), se exhibe el sitio de acoplamiento más estable y se presenta a L-P sobre el sitio de formación (representación en líneas azules del esqueleto de los aa y líneas verdes la molécula de NQ). La molécula de NQ se muestra con sus radios de Van der Waals para una mejor visualización de la interacción. Se etiquetan el A1 y A3 de los monómeros ya que a su alrededor se llevan a cabo las interacciones más favorables.

En la columna 2 de las tablas 6.2-6.3 (figura 6.6 B) se presenta el acercamiento al sitio donde se genera L-P más estable de este grupo; el esqueleto de los aa que están involucrados en el acoplamiento NQ-canal-molde, se muestra en forma de líneas azules junto con su nomenclatura de tres letras. En caso particular, la interacción con la metionina de interés se resalta con un asterisco, mientras que los puentes de hidrógeno establecidos con el programa se muestran como líneas punteadas verdes. Considerando los radios de Van der Waals de NQ y de los aa próximos al sitio donde ocurre el acoplamiento L-P, se determinaron las interacciones cercanas.

146 V. Petronilli, P. Constantini, L. Scorrano, R. Colonna, S. Passamonti, P. Bernardi, The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols. *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 16638-16642.

147 H. Salazar, I. Llorente, A. Jara-Oseguera, R. Garcia-Villegas, M. Munari, S. Gordon, L. Islas, T. Rosenbaum, A single N-terminal cysteine in TRPV1 determines activation by pungent compounds from onion and garlic. *Nature Neurosci.* 11 (2008) 255-261.

148 W. Feng, G. Liu, R. Xia, J. Abramson, I. Pessah, Site-Selective modification of hyperreactive cysteines or ryanodine receptor complex by quinones. *Mol. Pharm.* 55 (1999) 821-831.

La columna 3 representa la energía de acoplamiento (ΔG) únicamente del confómero más estable del grupo. Mientras que en la columna 4 (p) se muestra el número de confómeros (con base en 100 mejores confómeros) con coordenadas e interacciones similares durante el acoplamiento (probabilidad p). Finalmente en la columna 5 se describen las interacciones cercanas de los p confómeros NQ–canal–molde como: **Puentes de H**, formación de puentes de hidrógeno, **Hidrofóbicas**, interacciones principalmente apilamientos tipo π con aa aromáticos y **Cercanas**, principalmente con aa ácidos e hidroxilados.

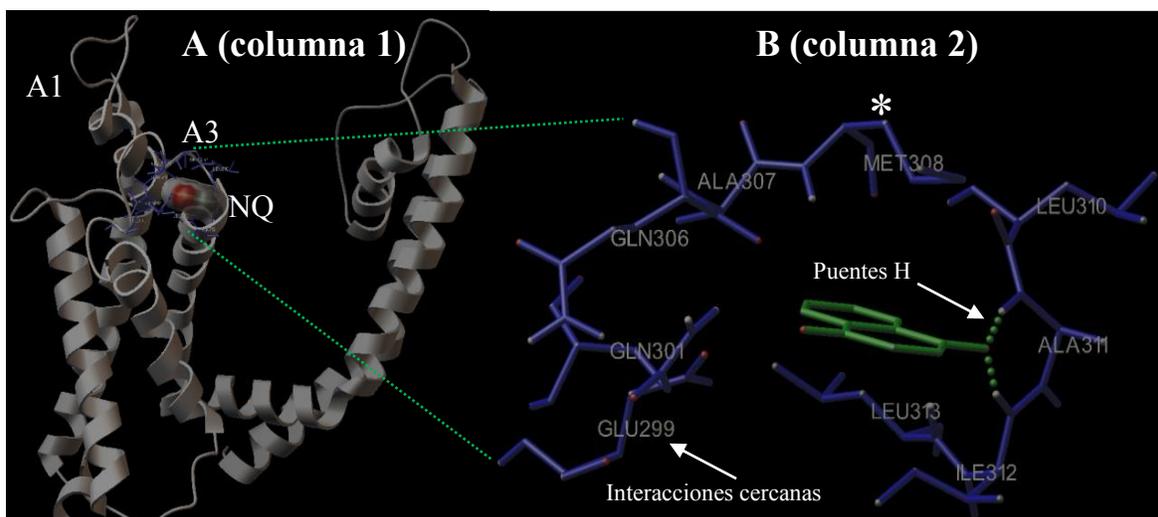


Figura 6.6. Representación de columna 1 (A) y columna 2 (B) de tablas 6.2-6.3. A: Acoplamiento NQ–canal más estable mostrando sobre el sitio de *P* donde ocurre. B: Representación en forma de líneas de los aa con los que interacciona la NQ para generar el confómero más estable.

En la tabla 6.2 primera columna, se observa que los acoplamientos más estables se llevan a cabo por la parte extracelular de las proteínas principalmente sobre el A1, A3 o bien entre ambas asas. El estudio de acoplamiento de rKv1.3_2r9rB (tabla 6.2, primera fila) demostraron que el complejo más estable ($\Delta G -5.20$) NQ–rKv1.3_2r9rB–A3–M308 (NQ–canal_molde–dominio–aa, notación simplificada que se utilizará a partir de este momento) se forma con una probabilidad del 65%, dentro de una cavidad constituida por los aa especificados en la tabla 6.4. Este acoplamiento L–*P* se estabiliza vía puentes de hidrógeno con aa no polares, hidroxilados y ácidos (Ala298, Ala311, Leu312, Ser239 y Glu299) y se encontraron interacciones cercanas especialmente con aa hidroxilados, Ser236 y Ser239.

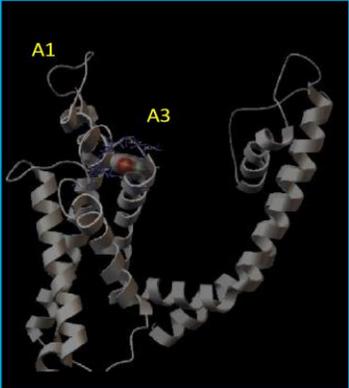
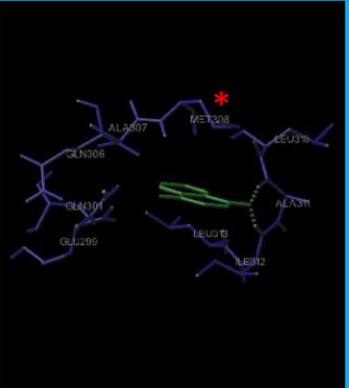
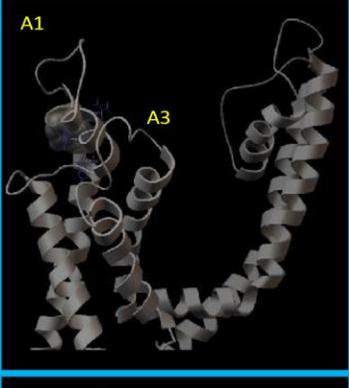
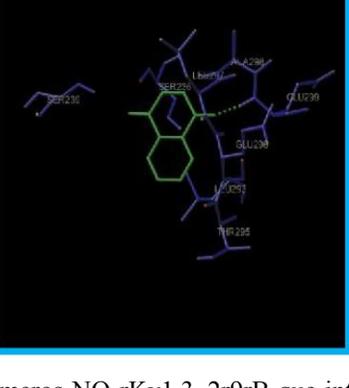
Sitio de acoplamiento NQ-rKv1.3_2r9rB	Interacciones finas de Acoplamiento NQ-rKv1.3	ΔG	p	Interacciones
		-5.20	65	*Met308 Puentes H: Ser239,Ala298, Glu299,Ala311, Leu312 Cerca : Ser236,Ser239, Thr292,Glu296, Glu299
		-4.85	18	Hidrofóbicas: Phe209, Phe245 Cerca: Glu204,Arg210 Glu212,Asn222 Ser230, Ser237
		-4.78	9	Puentes H: Asn228, Ser239 Ala298, Glu299 Cerca: Asn228, Ser230, Ser236, Ser237, Ser239, Thr292, Glu296, Thr298, Glu299

Tabla 6.2 Agrupamiento de conformeros NQ-rKv1.3_2r9rB que interactúan por la parte extracelular de la proteína. Primera columna: Monómero de rKv1.3 donde se muestra el sitio de acoplamiento NQ-rKv1.3 cerca de A1 y A3 extracelular. Segunda columna: interacciones finas con aa implicados en el acoplamiento NQ-rKv1.3. Tercera columna: ΔG de acoplamiento obtenido directamente de resultados de docking. Cuarta columna: Probabilidad, p, es el # de conformeros que se llegan a formar en ese sitio de acoplamiento. Quinta fila: Tipo de interacciones que se observan en la formación de conformero de interés. Puentes H, se refiere a puentes de hidrógeno que arroja el programa. Cerca, se refiere a interacciones cercanas de algunos aa con NQ. Hidrofóbicas, se refieren a interacciones tipo pi con aa aromáticos.

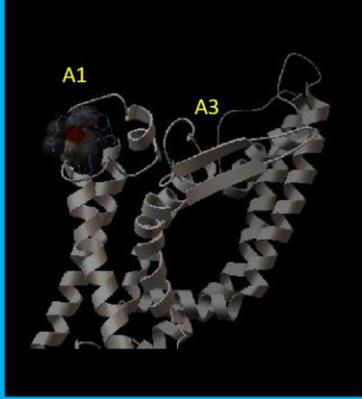
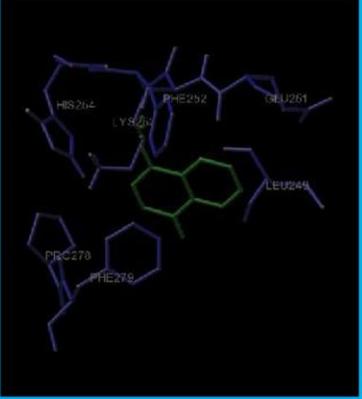
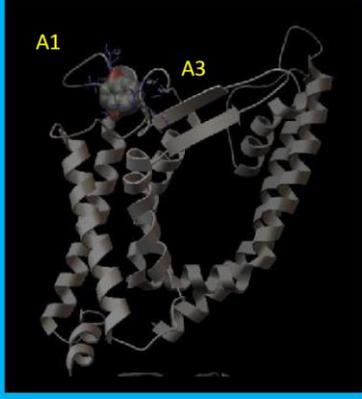
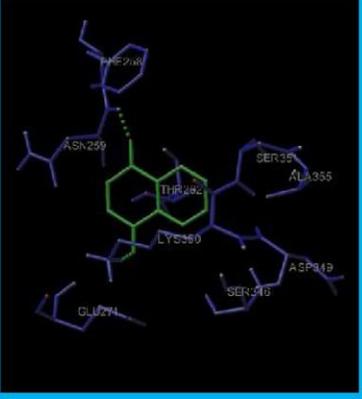
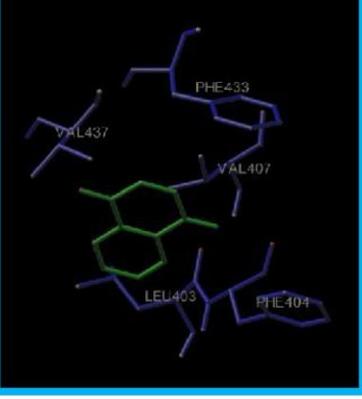
Sitio de acoplamiento NQ-dShIR_2r9rB	Interacciones finas de acoplamiento NQ-dShIR	ΔG	p	Interacciones
		-3.96	22	<p>Puentes H: Lys253, His254</p> <p>Hidrofóbicas: Phe252, His254, Tyr255, Phe258, Phe279</p> <p>Cerca: Glu251, Glu271,</p>
		-3.68	26	<p>Puentes H: Asn259, Lys253, Ser346</p> <p>Hidrofóbicas: Phe258</p> <p>Cerca: Asn259, Thr262, Asn263, Asp270, Glu271, Ser346, Asp349, Ser351,</p>
		-3.41	17	<p>Hidrofóbicas: Phe404, Phe433</p>

Tabla 6.3. Agrupamiento de conformeros NQ-dShIR_2r9rB que interactúan por la parte extracelular de la proteína. Primera columna: Monómero de dShIR donde se muestra el Sitio de acoplamiento NQ-dShIR cerca de A1 y A3 extracelular. Segunda columna: interacciones finas con aa implicados en el acoplamiento NQ-dShIR. La molécula de NQ se denota en forma de barras y las esferas representan los radios de Van Der Waals de cada uno de los átomos involucrados en el acoplamiento. Tercera columna: ΔG de acoplamiento obtenido directamente de resultados de docking. Cuarta columna: Probabilidad, p, es el # de conformeros que se llegan a formar en ese sitio de acoplamiento. Quinta fila: Tipo de interacciones que se observan en la formación de conformero de interés. Puentes H, se refiere a puentes de hidrógeno que arroja el programa. Cerca, se refiere a interacciones cercanas de algunos aa con NQ. Hidrofóbicas, se refieren a interacciones tipo pi con aa aromáticos.

Por otra parte, en rKv1.3_2r9rB-A1 (tabla 6.2, segunda fila) se observaron hasta 18 acoplamientos menos estables en A3 (ΔG -4.85). En ellos, se demostró la presencia de interacciones de tipo hidrofóbicas con aa aromáticos (Phe209 y Phe245) sin formación de puentes de hidrógeno. También se encontraron interacciones cercanas con aa del tipo ácidos (Glu204 y Glu212), cargados (Arg210), e hidroxilados (Ser230, Ser237).

Se observaron únicamente nueve interacciones entre A1 y A3 (tabla 6.2, tercera fila). Estos acoplamientos son menos estables que los que se dan sólo en A1 o A3 (ΔG -4.78). Las interacciones mediante puentes de hidrógeno y cercanas vuelven a observarse con los mismos aa arriba mencionados para A1 y A3 (Puentes de hidrógeno con aa hidroxilados, ácidos y no polares: Ser239, Ala298 y Glu299; Cercanas con aa hidroxilados: Ser230, Ser236, Ser237, Ser239)

Finalmente, se localizaron dos interacciones (no se muestran) en la parte superior de S2 y S3 que se consideran poco significativas debido a su estabilidad (ΔG -4.58) y probabilidad de que ocurran ($p=2$). Se encontraron resultados similares con rKv1.3_3lutB, hKv1.3_2r9rB y hKv1.3_3lutB (véase análisis en anexo 3, tablas A3.2-A3.4).

Canal_molde	aa que forman la cavidad de interés
rKv1.3_2r9rB y 3lutB	Ala298, Glu299, Arg300, Gln301, Gly302, Asn303, Gly304, Gln305, Gln306, Ala307, Met308, Ser309, Leu310, Ala311, Ile312 y Leu313

Tabla 6.4. aa que constituyen la cavidad en A3 del canal rKv1.3.

Por otra parte, en dShIR_2r9rB (tabla 6.3) se demostró que la formación del complejo más estable no ocurre con la Met356 como en Kv1.3. Esto se debe a la poca disponibilidad de la metionina en dShIR para interaccionar, ya que la hoja β -plegada de A3 (conformada por 28 aa) la apantalla. Así mismo, no hay formación de la cavidad en cuyo interior se habían observado las interacciones con Met356. Los resultados demuestran que el complejo más estable (ΔG -3.96) con 22% de los confórmeros se genera en A1 (tabla 6.3, primera fila). Este acoplamiento L-P se estabiliza mediante puentes de hidrógeno con His245 y Lys250 e interacciones cercanas con Glu251 y Glu269; así mismo, están favorecidas interacciones

hidrofóbicas con Phe252, His254, Tyr255 y Phe279. Adicionalmente, 26% de los conformeros se generan entre A1 y A3 con ΔG -3.68 (tabla 6.3, segunda fila). En estos acoplamientos hay formación de puentes de hidrógeno con Asn259, Ser346 y Lys350, así como interacciones cercanas con Asn259, Thr262, Asn263, Asp270, Glu271, Ser346, Asp349 y Ser351 e interacciones hidrofóbicas con Phe258. En caso particular de dShIR, se encontraron 17 acoplamientos de baja energía (ΔG -3.41) presentes en el vestíbulo del poro donde sólo se observan interacciones hidrofóbicas con Phe404 y Phe433 (tabla 6.3, tercera fila).

Con base en lo anterior, para Kv1.3 (humano o de rata) y con ambos moldes (2r9rB o 3lutB), se observa la presencia de una cavidad en A3 (tabla 6.4 y tabla A3.1) que es vital para la interacción con la metionina de interés (Met308 y Met358). En esta cavidad, hay formación de puentes de hidrógeno principalmente con aa como Ala y Leu y es aquí, donde se generan los conformeros más estables (ΔG más negativos, véase tablas 6.2 y A3.2-A3.4, primera fila). Se demostró, que independientemente de la forma que adopta el A1 en Kv1.3 (2r9rB o 3lutB) en este sitio, se favorecen interacciones hidrofóbicas con aa aromáticos como Phe. Interacciones cercanas con aa ácidos como Glu e hidroxilados como Ser (tabla 6.2 y A3.2-A3.4, segunda fila) también ocurren en el mismo sitio. Finalmente, en los acoplamientos formados entre A1 y A3, están involucradas principalmente interacciones con Ser, Glu, Thr y Phe, (tablas 6.3 y A3.2-A3.4, tercera fila).

Por otra parte, en dShIR las interacciones más importantes ocurren en A1 y están favorecidas las interacciones hidrofóbicas con Phe (véase tabla 6.3, primera y tercera fila). Mientras que, los conformeros que se generan entre A1 y A3, presentan interacciones cercanas con aa ácidos como Glu y Asp, así como con Ser, Thr y Asn (tabla 6.3, segunda fila). Todas las interacciones descritas a partir de los estudios de acoplamiento concuerdan con las hipótesis propuestas en el capítulo 5 de este trabajo que involucran interacciones hidrofóbicas, con metionina y formación puentes de hidrógeno.

Los estudios por VC descritos en el capítulo 4, demostraron que la reducción de NQ requiere menos energía cuando ocurre en un ambiente hidrofílico. Entonces, los sitios ricos en serinas en A1 cerca de A3 en Kv1.3, pueden mimetizar un ambiente más propicio para la interacción NQ-Met. En dShIR, la misma reducción sería más difícil de efectuarse, debido a los sitios de interacción con aa aromáticos (simulando el ambiente hidrofóbico del DMSO). Adicionalmente, se demostró que la reducción de NQ es facilitada por puentes de hidrógeno ya que se estabilizan mejor las especies formadas. Este efecto, podría ocurrir en la cavidad de A3 en Kv1.3 donde se observaron acoplamiento que involucran puentes de hidrógeno principalmente con Ala y Leu. Por otra parte, el hecho de que en A1 de Kv1.3 se observen diversas interacciones con Phe, sugiere que la NQ podría quedar “atrapada” entre los aa aromáticos de ese sitio. Lo anterior, también aumentaría el tiempo de permanencia de la NQ en ese lugar, que a su vez está muy próximo a la cavidad de A3. Considerando los resultados EQ y el estudio de acoplamiento, se plantea que la interacción NQ-rKv1.3 está más favorecida y estabilizada por los puentes de hidrógeno dentro de la cavidad en A3. Lo contrario ocurre con dShIR, ya que en este canal sólo están beneficiadas las interacciones hidrofóbicas que en este caso, comprometen la interacción de NQ con el sitio redox.

Finalmente, los resultados EF descritos en el capítulo 5, demostraron que la inhibición de rKv1.3 en presencia de NQ es menos reversible que en dShIR. Los estudios de acoplamiento, manifiestan que el mecanismo de inhibición ocurre dentro la cavidad de A3 que se observa únicamente para Kv1.3. Cabe destacar, que en esta misma cavidad se encontraron los acoplamiento más estables y precisamente, involucran la interacción con la metionina de interés.

En un intento de verificar que la interacción NQ-Kv1.3 esta modulada por el potencial redox de NQ, se realizaron los acoplamiento con 5OHNQ y 2NH₂NQ, ya que presentaron diferencias significativas de E_{red} e inhibición de I_K de los canales en estudio (Figura 5.10). Los resultados para Kv1.3 y dShIR se presentan en las tablas 6.5 y 6.6 respectivamente; únicamente se muestran los conformeros más estables en cada caso, otras interacciones de 5OHNQ y 2NH₂NQ se presentan en el anexo 3 tablas A3.5-A3.8.

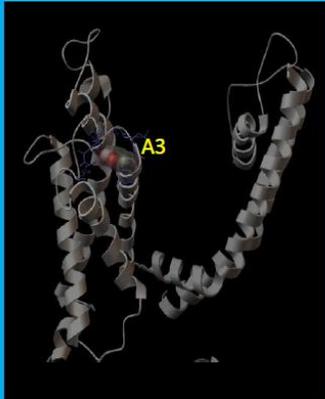
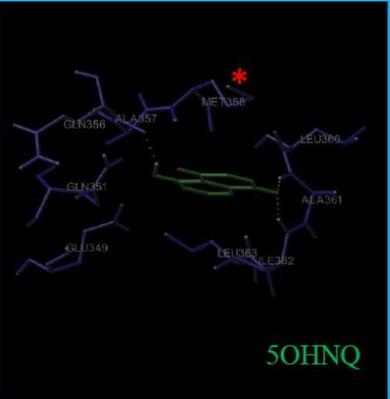
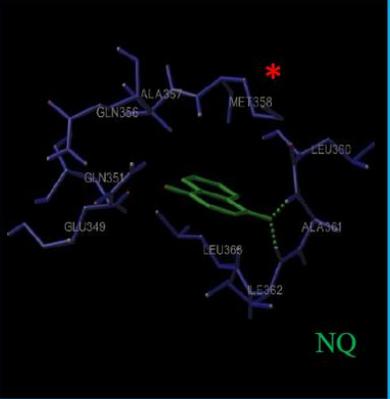
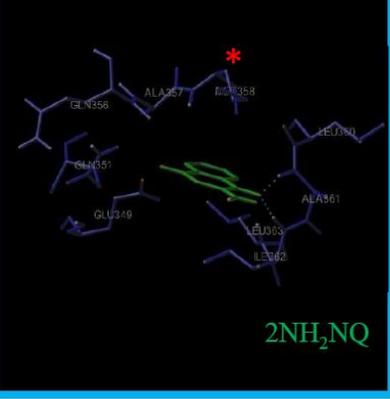
Acoplamiento de NQs en A3 de Kv1.3	Interacciones finas de acoplamiento NQs-Kv1.3	ΔG	p	Interacciones
		-5.31	29	*Met358 Puentes H: Gln351, Gln356 Ala361, Ile362, Leu363 72 (2.5) Cerca : Glu349, Gln351, Gln356
		-5.27	45	*Met358 Puentes H: Ala361, Ile362, Leu363 54 (1.6) Cerca : Glu349, Gln351, Gln356
		-5.46	30	*Met358 Puentes H: Glu349, Met358 Ala361, Ile362, 52 (1.7) Cerca : Glu349, Gln351, Gln356

Tabla 6.5 Agrupamiento de conformeros NQs-Kv1.3 que interactúan por la parte extracelular de la proteína. Primera columna: Monómero de Kv1.3 donde se muestra el Sitio de acoplamiento NQs-Kv1.3 cerca de A3 extracelular. Segunda columna: interacciones finas con aa implicados en el acoplamiento NQs-Kv1.3. Las moléculas de NQs se denotan en forma de barras. Tercera columna: ΔG de acoplamiento obtenido directamente de resultados de docking. Cuarta columna: Probabilidad, p, es el # de conformeros que se llegan a formar en ese sitio de acoplamiento. Quinta fila: Tipo de interacciones que se llevan a cabo para la formación del conformero de interés. Puentes H, se refiere a puentes de hidrógeno formados que arroja el programa, debajo, se muestra el total de puentes de hidrógeno encontrados y su razón con el total de conformeros en el sitio. Cerca, se refiere a interacciones cercanas de algunos aa con NQ. 5OHNQ, 5-hidroxi-1,4-naftoquinona; NQ, 1,4-naftoquinona; 2NH₂NQ, 2-amino-1,4-naftoquinona

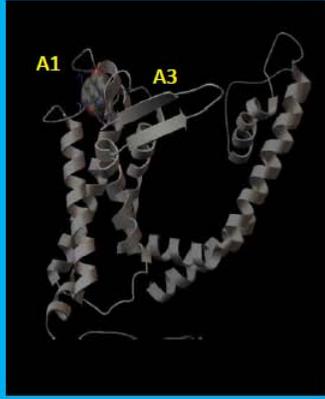
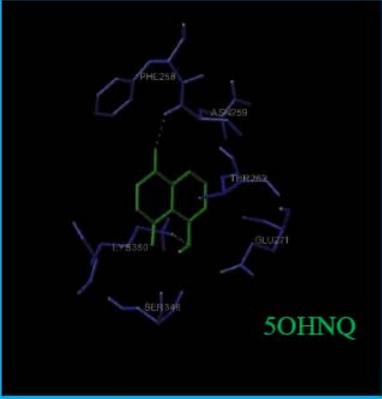
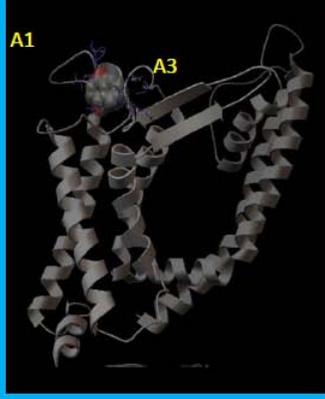
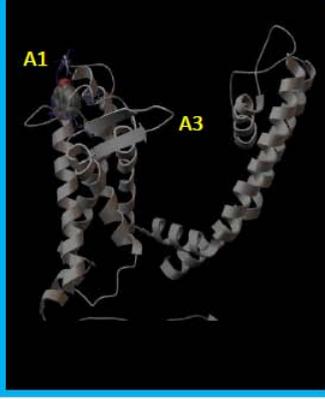
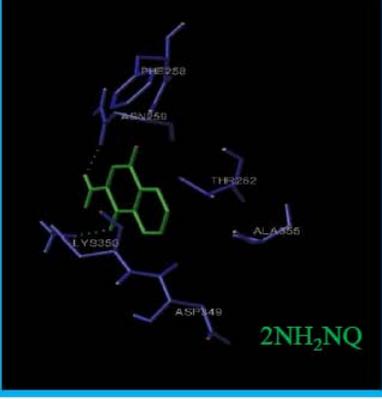
Acoplamiento de NQs entre A1 y A3 ShIR	Interacciones finas de acoplamiento NQs-ShIR	ΔG	p	Interacciones
		-4.33	29	Puentes H: Asn259, Ser346, Lys350 29 (1.4) Hidrofóbicas: Phe258, Pro273, Pro347 Cerca: Thr262, Glu271, Asp349, Ser351
		-3.68	26	Puentes H: Asn259, Lys253, Ser346 33 (1.3) Hidrofóbicas: Phe258 Cerca: Asn259, Thr262, Asn263, Asp270, Glu271, Ser346, Asp349, Ser351,
		-4.36	27	Puentes H: Asn259, Asp270, Glu271, Lys350, Ser346, Asp349 53 (1.96) Hidrofóbicas: Phe258, Pro273, Phe280, Pro347 Cerca: Thr262, Ser351, Ser352

Tabla 6.6 Agrupamiento de conformeros NQs-dShIR que interactúan por la parte extracelular de la proteína. Primera columna: Monómero de Kv1.3 donde se muestra el Sitio de acoplamiento NQs-Kv1.3 cerca de A3 extracelular. Segunda columna: interacciones finas con aa implicados en el acoplamiento NQs-Kv1.3. Las moléculas de NQs se denotan en forma de barras de color verde. Tercera columna: ΔG de acoplamiento obtenido directamente de resultados de docking. Cuarta columna: Probabilidad, p, es el # de conformeros que se llegan a formar en ese sitio de acoplamiento. Quinta fila: Tipo de interacciones que se llevan a cabo para la formación del conformero de interés. Puentes H, se refiere a puentes de hidrógeno formados que arroja el programa, debajo, se muestra el total de puentes de hidrógeno encontrados y su razón con el total de conformeros en el sitio. Cerca, se refiere a interacciones cercanas de algunos aa con NQ. 5OHNQ, 5-hidroxi-1,4-naftoquinona; NQ, 1,4-naftoquinona; 2NH₂NQ, 2-amino-1,4-naftoquinona

Se observa que en Kv1.3 la NQ, 5OHNQ y 2NH₂NQ presentan las interacciones más estables ($\Delta G \sim -5.3$) en la cavidad de A3 con Met358 (tabla 6.5). Con las tres quinonas, se encontró generación de puentes de hidrógeno con Ala e Ile e interacciones cercanas con Glu y Gln.

En el caso de dShIR (tabla 6.6) los acoplamiento más estables de 5OHNQ y 2NH₂NQ ocurren en A1 ($\Delta G \sim -4.3$) donde las interacciones hidrofóbicas con aa aromáticos están favorecidas. En caso particular de NH₂NQ-dShIR_2r9rB se observaron 8 interacciones cercanas a Met358 pero poco estables, $\Delta G -3.8$ (para mayor detalle véase tabla A3.8 en anexo 3). El ligero acercamiento NH₂NQ-dShIR_2r9rB(Met356) puede explicar la inhibición de corrientes observada en los ensayos EF (figura 5.10).

		2NH ₂ NQ		NQ		5OHNQ	
EQ	$E_{1/2}^I$ (DMSO) (V vs Fc ⁺ /Fc)	-1.296		-1.024		-0.842	
	E_{pc}^I (ND 96) (V vs Fc ⁺ /Fc)	-0.64		-0.45		-0.43	
EF	canal	Kv1.3	dShIR	Kv1.3	dShIR	Kv1.3	dShIR
	% Inhibición	5.04	8.74	15.88	3.39	25.28	2.79
Docking	ΔG	-5.46	-4.36	-5.27	-3.68	-5.31	-4.33
	%Extracelular	84	65	85	65	79	53
	%Met	42	6	65	–	40	4
	$L-P_{Ptes H^{\Delta G^-}}/L-P_T$	1.7	1.9	1.6	1.2	2.5	1.4
	$L-P_{Hidrofóbicas}/L-P_T$	–	0.8	–	0.6	–	0.8
	$L-P_{Serinas}$	–	++	–	+++	–	++

Tabla 6.7 Tabla de comparación de experimentos EQ, EF y de acoplamiento (Docking) de NQ, 2NH₂NQ y 5OHNQ. $E_{1/2}^I$ (DMSO) y E_{pc}^I (ND-96) se refiere al potencial de media onda y de pico catódico de la señal I determinado en medio DMSO y ND 96 respectivamente. %Extracelular es el porcentaje de confórmers NQ-canal formados por la parte extracelular de Kv1.3 y dShIR. %Met es el porcentaje de confórmers que interaccionan con la metionina en A3. $L-P_{Ptes H^{\Delta G^-}}/L-P_T$ y $L-P_{Hidrofóbicas}/L-P_T$ se refiere a la relación de $L-P$ más estables que presentaron puentes de hidrógeno ($L-P_{Ptes H^{\Delta G^-}}$) e interacciones hidrofóbicas ($L-P_{Hidrofóbicas}$) entre el total de confórmers ($L-P_T$). $L-P_{Serinas}$ indica el grado de interacciones cercanas principalmente con serinas de los confórmers más estables.

El análisis del conjunto de resultados obtenidos (tabla 6.7) demuestra que aunque el ΔG de los acoplamientos NQs–canal no sigue alguna tendencia con los E_{red} determinados, definitivamente proponen que la interacción NQ–Kv1.3 es más importante que con dShIR (ΔG más negativo) tal como se demostró con los ensayos EF (%Inhibición). A su vez, confirman que la interacción de NQ ocurre concluyentemente por la parte extracelular de la proteína (%Extracelular) tal como lo sugieren los ensayos EF. Así mismo, resaltan el hecho de que es necesario que la Met358 se encuentre expuesta como en Kv1.3, para la interacción con NQ (%Met). A diferencia de dShIR, donde al estar oculta en la estructura β -plegada de A3, no ocurre esta interacción y se ve reflejado en los ensayos EF. Lo anterior, también concuerda con lo que se propone a partir del análisis detallado de secuencias.

En definitiva, los resultados plantean que la interacción NQ–rKv1.3 ocurre debido a la naturaleza oxidante y estructura de NQ, seguramente vía una reacción redox con Met 358 (dependencia de %inhibición vs E_{red}). Ésta a su vez, esta favorecida por puentes de hidrógeno que pueden estar beneficiados dentro de la cavidad en A3, donde se estabilizarían mejor las especies reducidas de NQ ($L-P_{Ptes H}^{\Delta G^-}/L-P_T$) tal como se observó en los ensayos EQ. Por último, se demuestra que otras interacciones cerca del sitio de reconocimiento (interacciones hidrofóbicas tipo apilamientos– π) en algunos casos disminuyen la probabilidad de que NQ llegue a la Met358 para así provocar la inhibición de rKv1.3 ($L-P_{Hidrofóbicas}/L-P_T$) o bien, pueden aumentar la permanencia de NQ cerca del sitio de acción.

CAPÍTULO 7

DISCUSIÓN

Como ya se ha mencionado, los canales Kv1.3 y dShIR pertenecen a la misma familia de canales de K⁺ de 6S-1P y en particular, el Kv1.3 se encuentra relacionado con diversas afecciones que hoy en día son un problema para el ser humano, por lo tanto la búsqueda de inhibidores específicos de este canal y sus mecanismos de inhibición, pueden ofrecer una nueva opción terapéutica.

Particularmente, este trabajo se formuló basándonos en una amplia revisión de publicaciones relacionadas con otros canales de la misma familia, en específico del BK o maxicanal. Nuestra atención se enfocó en la particularidad de que el timol (derivado del fenol) activa al BK, mientras que la NQ lo inhibía. Debido a que estos compuestos presentan una estructura similar, pero propiedades redox diferentes, llamó nuestra atención la diferencia de actividades. Existen diversos estudios electroquímicos con NQ que intentan establecer la relación entre el potencial redox de éstas y su estructura, pero ¿cuál de éstos será más importante para modular la actividad de canales iónicos? Y entonces ¿se podría modular la actividad de los mismos con una especie con cierto potencial establecido?

Cuando este trabajo se inició, no había reportes en la literatura de una posible relación entre la naturaleza redox de los moduladores de canales iónicos y su efecto en éstos. Así que dada la importancia de estas proteínas, su actividad y posible modulación, se realizó este proyecto con el propósito de establecer si existe una relación entre el potencial redox de algunas naftoquinonas y su actividad sobre canales de potasio 6S-1P. El intentar responder esta pregunta, nos llevó a evaluar el potencial redox de algunas NQ mediante VC en medios que pudieran mimetizar el ambiente celular, evaluar la bioactividad sobre los canales Kv1.3 y dShIR y establecer la forma de interacción causal de dicha actividad como forma de modulación. Para ello, se ensayaron cinco naftoquinonas (NQ, 5OHNQ, 2NH₂NQ, 2SO₃KNQ, 2MeONQ) con diferentes efectos estructurales.

7.1. Ensayos Electroquímicos

Los estudios electroquímicos por VC en DMSO demostraron que a pesar de que las NQs evaluadas presentan diferencias estructurales poco significativas, algunas de éstas muestran variaciones reveladoras en cuanto a su potencial redox (tabla 4.1). De acuerdo con los resultados podemos deducir que los efectos inductivos o electrónicos (electrodonadores o electroattractores) son importantes para establecer el potencial redox de estas especies (figura 4.3) tal como lo sugieren diversos autores⁸⁷⁻⁹¹. Sin embargo, la basicidad, simetría de las especies electrogeneradas así como su capacidad de generar puentes de hidrógeno intramoleculares resultó ser aún más importante para establecer el potencial redox. La mayor diferencia de potencial entre las NQs ensayadas fue de 454 mV entre 2NH₂NQ y la 5OHNQ, y de ~200 mV con respecto a NQ para cada una de ellas, por lo que fueron seleccionadas para realizar los ensayos electrofisiológicos.

En conjunto con lo anterior, los ensayos por VC en ND 96 demostraron que la relación entre el potencial redox de las NQs en estudio y las propiedades (debido a sus efectos estructurales) se mantiene tanto en medio hidrofóbico como en hidrofílico (tabla 4.2). El hecho de que las diferencias de potencial disminuyeran a la mitad del valor calculado en DMSO, sugiere que los efectos electrónicos en este medio son menos significativos para la estabilización de las especies. A su vez, demostraron que aunque la relación de potenciales se conserva, el mecanismo de reducción se modifica dramáticamente pasando de mono electrónico en dos etapas a bi-electrónico en una etapa (figura 4.1 y 4.6) al cambiar de medio¹¹⁷⁻¹¹⁸. De acuerdo con los posibles mecanismos de reducción establecidos, se puede deducir que la formación de puentes de hidrógeno y/o transferencia de protones, son una clave importante en el control del mecanismo y potencial de reducción de las quinonas tal como lo sugieren diversos grupos de trabajo^{109-112, 114-118}. Y quizás éstos, se encuentren íntimamente relacionados con la modulación de los canales iónicos.

7.2. Ensayos Electrofisiológicos

Los ensayos por TEVC con ovocitos de *Xenopus laevis* heteroexpresados demostraron que a pesar de que Kv1.3 y dShIR pertenecen a la misma familia, en presencia de NQ en dShIR el efecto es poco significativo; mientras que las corrientes de Kv1.3, se inhiben más y de manera irreversible (figura 5.5). Esto, sugiere que la interacción NQ-Kv1.3 es importante ya que no se logra eliminar aún con lavados exhaustivos.⁷⁵⁻⁷⁸ A su vez, se comprobó que ésta no ocurre con el sensor de voltaje de Kv1.3 a pesar de la naturaleza oxidante de NQ, ya que no presenta dependencia con el potencial aplicado en los experimentos¹³⁵ (figura 5.7). Estudios realizados con otros compuestos oxidantes demostraron esta característica de NQ y aún más importante su estructura, es necesaria para inhibir las corrientes de Kv1.3. Sin duda, la estructura química tipo NQ es un factor importante para la actividad inhibitoria de Kv1.3 (figura 5.8).

Los ensayos con las NQs que presentaron la mayor diferencia de potencial redox (2NH₂NQ y 5ONHQ), demostraron que la inhibición de las corrientes de potasio de Kv1.3 que provocan, es dependiente de su potencial redox (figura 5.10). Opuesto a esto, en dShIR no se observó actividad significativa con las NQs. Entonces, ¿es la estructura tipo NQ o su potencial redox el parámetro que guíe la interacción con el canal? O bien ¿qué es lo que finamente modula el hecho de que en Kv1.3 ocurra una mayor inhibición que en dShIR? Los resultados se explicaron con base en posibles interacciones entre la NQ y algunos residuos y zonas de aminoácidos de la estructura primaria de los canales (figura 5.11) y se establecieron tres hipótesis:

1. En zonas ricas en aa aromáticos como fenilalanina o triptófano la NQ puede intercalarse mediante apilamientos- π , entonces su efecto podría disminuir ya que estos impiden su llegada al sitio de interacción.
2. Si la inhibición de los canales en estudio es resultado de la oxidación de la metionina presente en el asa extracelular 3 por la NQ, entonces ambos se favorecen si esta metionina se encuentra expuesta para interactuar.

3. Si la reducción y estabilización de NQ se favorecen en ambientes hidrofílicos mediante interacciones vía puentes de hidrógeno, entonces la presencia de serinas cerca de la metionina facilitaría su oxidación dando como resultado la inhibición del canal.

Las hipótesis explican las diferencias observadas en los ensayos electrofisiológicos, la inhibición irreversible de las corrientes de Kv1.3 y la relación encontrada con el potencial redox de las NQs en estudio. Así mismo, ponen de manifiesto los efectos estructurales de las NQs y las diferencias en cuanto a su mecanismo de reducción. Entonces, con base en los resultados electrofisiológicos, electroquímicos y el análisis detallado de la secuencia primaria de los canales, se propuso que la inhibición de Kv1.3 está íntimamente relacionada con el potencial redox de las especies, su naturaleza y estructura. Pero, ¿qué otro sustento se tenía para comprobar estas hipótesis?

7.3. Estudios de Modelado Molecular

Intentando soportar las hipótesis arriba planteadas, se realizaron estudios de acoplamiento ligando-proteína (docking). Los modelos 3D de Kv1.3 y dShIR obtenidos demostraron que existen pequeñas diferencias entre estos canales, pero sobre todo en el asa A3 donde está presente la metionina de interés. Éstas, son principalmente en cuanto a número de aminoácidos que contiene y estructura secundaria o conformación espacial (figura 6.1 y 6.2) y se traducen en resultados experimentales electrofisiológicos importantes, inhibición significativa o no de las corrientes del canal.

Con el análisis de los 100 complejos más estables que se generaron, se demostró que la interacción de NQ-canal esta favorecida por la parte extracelular a pesar de la naturaleza hidrofóbica de la NQ (figura 6.4 y tabla 6.1). El estudio de docking demostró que la presencia de una cavidad localizada en el asa extracelular A3 en Kv1.3, es muy importante para la interacción con NQ. Dentro de esta cavidad, se localiza la metionina 358 de interés y se observó además la formación de puentes de hidrógeno que favorecen la interacción NQ-canal (figura 6.6 y tabla 6.4). Contrario a ShIR donde no hay tal cavidad, la interacción es poco probable.

Los resultados de docking demostraron que la interacción más favorable de 2NH₂Q, NQ y 5OHNQ con Kv1.3 se presentaron con la metionina 358 en la cavidad de A3 (tabla 6.7). La relación entre los ensayos electrofisiológicos y electroquímicos, sugieren que esta interacción es del tipo redox.

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES

Se demostró que 100 μM de 1,4-naftoquinona produce una actividad inhibitoria de ~16% sobre las corrientes de potasio de los canales Kv1.3 expresado de manera heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis* y de 3.39% sobre dShIR, a pesar de que ambos pertenecen a la misma familia Kv1.x. A esta misma concentración, la 2NH2NQ y 5OHNQ inhibieron las corrientes de Kv1.3 de manera dependiente de su potencial de reducción establecido en medio hidrofóbico como hidrofílico.

Se demostró que la naturaleza oxidante de NQ es importante, pero lo es aún más su estructura, para inhibir las corrientes de Kv1.3. Se propone que la inhibición es resultado de una reacción tipo redox con la metionina 358 de Kv1.3 y la NQ. Los resultados sugieren que la formación de puentes de hidrógeno y/o transferencia de protones, son una clave importante en el control del mecanismo y modulación de la inhibición de Kv1.3 en presencia de estructuras tipo NQ.

El trabajo es pionero en el uso de técnicas electroquímicas y electrofisiológicas para intentar demostrar que el potencial redox y la estructura molecular de los compuestos están relacionados con la modulación del canal iónico Kv1.3.

Una importante contribución de este trabajo es la estrategia experimental utilizada en un intento de simular los ambientes celulares (hidrofóbico e hidrofílico) a los que la NQ se enfrenta cuando interacciona con el canal iónico, ya que dicha estrategia puede ser empleada de manera simple y fina para pre-seleccionar los mejores compuestos a ser evaluados mediante técnicas electrofisiológicas.

PERSPECTIVAS

1. Corroborar las interacciones propuestas con aproximaciones computacionales más cercanas a la actividad *in vivo* como la dinámica molecular.
2. Corroborar la importancia de la metionina 358 en Kv1.3 y dShIR mediante mutaciones sitio-dirigidas.
3. Ensayar con otras estructuras tipo quinonas más complejas intentando evaluar la importancia de la cavidad de A3 así como la disposición de la metionina 358.
4. Evaluar el uso de otras técnicas que permitan “aislar” el complejo NQ-Kv1.3 y verificar la reacción redox.
5. Evaluar el efecto de estos compuestos en el Maxicanal o BK.

ANEXO 1: ELECTROQUÍMICA

A1.1. Sistema de referencia Ferrocinio /Ferroceno (Fc^+/Fc).

En ensayos electroquímicos la elección del electrodo de referencia a emplear no es un proceso trivial, esta designación debe hacerse considerando el tipo de disolvente a utilizar, el electrolito soporte seleccionado y la complejidad de la muestra a analizar. Para disoluciones no acuosas no hay un electrodo de referencia –tan fiable- equivalente al electrodo normal de hidrógeno acuoso (ENH). Sin embargo, en el laboratorio este electrodo no es práctico de manipular. Para análisis en disoluciones acuosas el electrodo de referencia preferido es el de calomel saturado (ECS). No obstante, su aplicación en medios no acuosos está limitada. Debido a esto, se han introducido electrodos de referencia con base en sales de plata (nitratos o percloratos) útiles e inmersos en medios no acuosos. Estos electrodos, además eliminan el componente de la parte del potencial de unión debido al límite de las fases que afecta la medida de los potenciales. Sin embargo, las escalas y conversiones a otros sistemas de referencia no siempre son confiables ya que en la mayoría de las ocasiones, no se hace mención de la concentración real de la sal de plata.^{149,150} La IUPAC ha propuesto el uso del sistema de referencia interno Ferrocinio / Ferroceno (Fc^+ / Fc) para la presentación, publicación y adecuada comparación de los potenciales redox en sistemas no acuosos, independientemente del electrodo de referencia empleado.¹⁵¹ Sin embargo, aún con su uso, en ocasiones la comparación de los potenciales obtenidos pierde cierta fiabilidad debido a que en realidad no han sido medidos en las mismas condiciones experimentales. Ante este panorama y debido a que se determinaron y compararon los potenciales redox de las especies en estudio en medio no acuoso y acuoso, se realizó el estudio del sistema Fc^+/Fc en ambos medios.

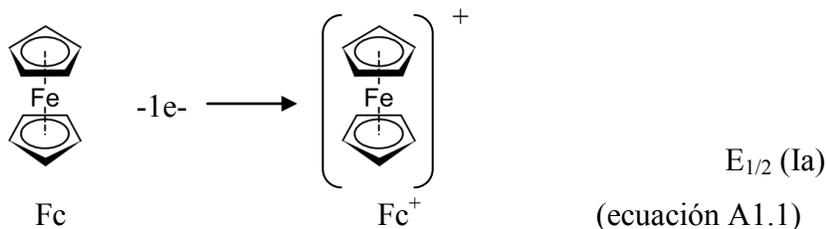
¹⁴⁹ M. Namazian, C. Yeh Lin, M. L. Coote, Benchmark Calculations of Absolute Reduction Potential of Ferricinium/Ferrocene Couple in Nonaqueous Solutions. *J. Chem. Theory Comput.* 6 (2010), 2721–2725

¹⁵⁰ V. Pavlishchuk, A. Addison. Conversion constants for redox potentials measured versus different reference electrodes in acetonitrile solutions at 25°C. *Inorg. Chimica Acta* 298 (2000) 97–102.

¹⁵¹ G. Gritzner, J. Kůta, Physical and biophysical chemistry division commission on electrochemistry. *Pure Appl. Chem.* 4 (1984) 461–466.

A1.1.1 Sistema Ferrocinio /Ferroceno (Fc^+/Fc) en DMSO.

Típicamente, los voltamperogramas de Fc en DMSO presentan una señal de oxidación que se atribuye a la ecuación A1.1 y una de reducción (voltamperograma no se muestra).



Se obtuvieron voltamperogramas de Fc en DMSO a diferentes velocidades de barrido de potencial (no se muestran) y el análisis de las corrientes (tabla A1.1) demostró que el proceso electroquímico es controlado por la difusión.¹⁵² La relación de $i_{pa}/i_{pc} \sim 1$ y el ΔE_p constante y cercano a 60 mV, sugieren que el sistema es rápido y reversible. Las funciones analizadas confirman que el sistema Fc^+/Fc es útil como sistema de referencia interno en DMSO.

	Fc^+/Fc (DMSO)	Fc^+/Fc (ND 96)
$ i_{pa} $	$241 v^{1/2} + 241$ (0.99)	$348 v^{1/2} + 981$ (0.99)
$ i_{pc} $	$241 v^{1/2} + 238$ (0.99)	$344 v^{1/2} + 801$ (0.99)
$E_{1/2}$	0.843 V	0.204 V
$ \Delta E_p $	$4.44 \times 10^{-4} \text{ Log } v + 0.06$ (0.19)	$0.0041 \text{ Log } v + 0.06$ (0.96)
$ i_{pc}/i_{pa} $	$0.02 \text{ Log } v + 1.01$ (0.45)	$0.0074 \text{ Log } v + 1.00$ (0.24)
$ i_{pa}^{1*} v^{1/2} $	$-66.5 \text{ Log } v + 263$ (0.98)	$3.21 \text{ Log } v + 34.35$ (0.97)
$ i_{pc}^{1*} v^{1/2} $	$-73.53 \text{ Log } v + 257$ (0.99)	$2.87 \text{ Log } v + 34.08$ (0.92)

Tabla A1.1. Datos electroquímicos de Fc^+/Fc en DMSO y ND 96

A1.1.2. Sistema Ferrocinio /Ferroceno (Fc^+/Fc) en ND 96.

Inicialmente, se consideró utilizar al ferrocenilmetanol (FcMeOH) debido a que el Fc es prácticamente insoluble en agua (no hay datos en la literatura que corroboren esta

¹⁵² R. Nicholson, I. Shain. Theory of Stationary Electrode Polarography Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems. Anal. Chem 36 (1964) 706-723.

información).^{153,154} Sin embargo, el trabajar con FcMeOH tiene como desventaja el adicionar un nuevo sistema de referencia interno que al final, no permitiría comparar los potenciales redox de una manera apropiada y directa. Se observó que la diferencia de potenciales entre Fc y FcMeOH en ND 96 no era significativa 0.204 y 0.219 V vs AgCl/Ag^o respectivamente. De acuerdo con lo anterior, se decidió estudiar al Fc en ND 96 aunque se trabajara a concentraciones bajas para su mantener su solubilidad; esto, con el fin de ser utilizado también como sistema de referencia en medio acuoso.

En la figura A1.1 se presenta el voltamperograma en dirección anódica de Fc en ND 96. De la misma forma que en DMSO, sólo se observó una señal de oxidación (Ia) y una de reducción (Ic).

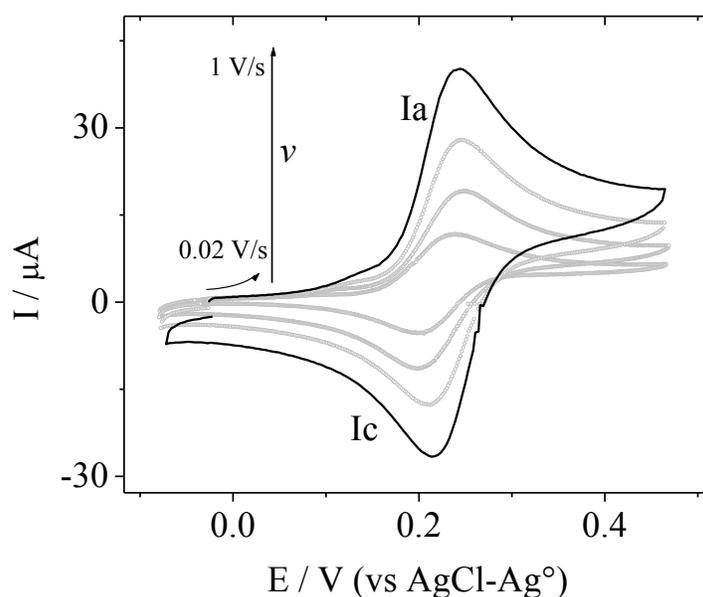


Figura A1.1 Voltamperogramas de Fc en ND 96 obtenidos en dirección anódica comenzando desde OPC a diferentes velocidades de barrido de potencial (sólo se muestran a 0.05, 0.1, 0.5 y 1V/s). E_T carbón vítreo (ϕ 7.1 mm²), E_{aux} Pt^o y E_R electrodo acuoso de Cl⁻(0.1 M)/AgCl/Ag^o.

¹⁵³ Hoja Técnica de Seguridad del Material, www.sigmaaldrich.com

¹⁵⁴ K. Defina, C. Ezell, Jr. Acree. Solubility of Ferrocene in Organic Nonelectrolyte Solvents, Comparison of Observed Versus Predicted Values Based upon Mobile Order Theory. Phys. and Chem. of Liq. 39 (2001) 699-710.

A partir de los experimentos se analizaron las corrientes de pico (tabla A1.1). Se determinó que el efecto de la variación de ν sobre i_{pa} e i_{pc} , sigue un comportamiento lineal que sugiere un proceso controlado por la difusión. El ΔE_p cercano a 60 mV y la relación de i_{pc}/i_{pa} en función de ν constante e igual a uno, demostraron que Fc en ND 96 se comporta como un sistema rápido y reversible, por lo tanto, útil como sistema de referencia interno en ND 96.

Los $E_{1/2}$ de Fc en DMSO y ND 96 se determinaron mediante la ecuación 4.4 del capítulo 4 de este trabajo y son 0.84 V y 0.20 V vs AgCl/Ag^o respectivamente. Estos valores se utilizaron para corregir los potenciales de NQs.

	2ANQ	2MeONQ	NQ	2SO ₃ NQ	5OHNQ
$ i_{pc}^I $	186.53 $v^{1/2} + 14.25$ (0.99)	181.31 $v^{1/2} + 14.06$ (0.99)	191.78 $v^{1/2} + 11.17$ (0.99)	140.53 $v^{1/2} + 4.43$ (0.99)	152.93 $v^{1/2} + 7.26$ (0.99)
$ i_{pa}^I $	175.67 $v^{1/2} + 17.01$ (0.99)	161.10 $v^{1/2} + 18.37$ (0.99)	158.02 $v^{1/2} + 16.22$ (0.99)	119.49 $v^{1/2} + 7.94$ (0.99)	128.32 $v^{1/2} + 2.53$ (0.99)
$ i_{pc}^{II} $	134.96 $v^{1/2} + 15.35$ (0.99)	135.20 $v^{1/2} + 15.76$ (0.99)	137.66 $v^{1/2} + 12.88$ (0.99)	96.33 $v^{1/2} + 7.37$ (0.99)	83.65 $v^{1/2} + 1.62$ (0.99)
$ i_{pa}^{II} $	159.41 $v^{1/2} + 15.20$ (0.99)	151.54 $v^{1/2} + 17.34$ (0.99)	142.86 $v^{1/2} + 15.51$ (0.99)	108.30 $v^{1/2} + 5.86$ (0.99)	89.44 $v^{1/2} + 0.31$ (0.99)
$E_{1/2}^I$	-1.296 V	-1.130 V	-1.024 V	-1.017 V	-0.842 V
$E_{1/2}^{II}$	-1.955 V	-1.896 V	-1.699 V	-1.634 V	-1.453 V
ΔE_{pc}^I	272 mV	106 mV	0 mV	7 mV	182 mV
ΔE_{pc}^{II}	256 mV	197 mV	0 mV	65 mV	246 mV
$ \Delta E_p^I $	0.023 Log $v + 0.017$ (0.92)	0.009 Log $v + 0.042$ (0.88)	0.018 Log $v + 0.069$ (0.85)	0.025 Log $v + 0.030$ (0.95)	0.005 Log $v + 0.058$ (0.37)
$ \Delta E_p^{II} $	0.008 Log $v + 0.094$ (0.88)	0.001 Log $v + 0.068$ (0.14)	0.003 Log $v + 0.038$ (0.56)	0.014 Log $v + 0.042$ (0.92)	0.038 Log $v + 0.149$ (0.99)
ΔE_{pc}^v	(+) 22 mV	(+) 4 mV	(-) 60 mV	(+) 45 mV	(+) 5 mV
ΔE_{pa}^v	(-) 18 mV	(-) 5 mV	(-) 50 mV	(-) 14 mV	(-) 26 mV
$ i_{pa}/i_{pc} ^I$	0.02 Log $v + 0.98$ (0.44)	0.06 Log $v + 0.92$ (0.82)	0.07 Log $v + 0.86$ (0.89)	0.08 Log $v + 0.87$ (0.95)	0.08 Log $v + 0.84$ (0.93)
$ i_{pa}/i_{pc} ^{II}$	0.03 Log $v + 0.86$ (0.81)	2×10^{-5} Log $v + 1.11$ (0.82)	0.04 Log $v + 1.04$ (0.67)	0.05 Log $v + 0.90$ (0.87)	0.03 Log $v + 1.04$ (0.44)
$ i_{pc}^{I*} v^{1/2} $	-42.19 Log $v + 197.27$ (0.99)	-51.08 Log $v + 175.51$ (0.99)	-33.20 Log $v + 200.28$ (0.98)	-12.69 Log $v + 144.11$ (0.97)	-19.98 Log $v + 157.72$ (0.92) A partir de 200 mV
$ i_{pa}^{I*} v^{1/2} $	-49.85 Log $v + 186.61$ (0.99)	-41.23 Log $v + 188.73$ (0.99)	-46.20 Log $v + 171.70$ (0.99)	-25.02 Log $v + 124.37$ (0.98)	-32.13 Log $v + 156.15$ (0.97) 12.48 Log $v + 153.16$ (0.86) A partir de 200 mV
$ i_{pc}^{II*} v^{1/2} $	-46.78 Log $v + 167.21$ (0.99)	-47.25 Log $v + 144.84$ (0.99)	-36.25 Log $v + 148.89$ (0.99)	-17.45 Log $v + 112.70$ (0.99)	-24.53 Log $v + 126.65$ (0.97) 37.49 Log $v + 138.02$ (0.98) A partir de 200 mV
$ i_{pa}^{II*} v^{1/2} $	-47.90 Log $v + 186.61$ (0.99)	-51.72 Log $v + 162.99$ (0.99)	-46.82 Log $v + 153.97$ (0.99)	-23.27 Log $v + 100.84$ (0.99)	-22.54 Log $v + 80.90$ (0.98) 40.20 Log $v + 143.17$ (0.96) A partir de 200 mV
					-21.61 Log $v + 85.03$ (0.99)

Tabla A1.2. Datos electroquímicos de NQs en DMSO (valores representan r^2)

A1.2. Estudios de simulación con DigiElch7.

Con el fin de intentar elucidar la señal VI observada en los ensayos EQ de 5OHNQ en DMSO (capítulo 4 de este trabajo), se realizó la simulación de voltamperogramas con uno de los programas más comunes en electroquímica, DigiElch7 (www.elchsoft.com). Para la simulación, se utilizaron los datos informados en la literatura por Macias-Ruvalcaba et al (J. Phys. Chem. C, 2010, 114 pp 1285-1292) que se aproximan a las condiciones experimentales de trabajo y se presentan en la tabla A1.3. La simulación de voltamperogramas se hizo a diferentes valores de ν (0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1, 2, 3, 5, 10 V/s) y se usaron los mismos valores de la tabla. Se consideró para las reacciones electroquímicas un coeficiente de transferencia electrónica (α) de 0.5, excepto para la ecuación (ec) 10 que fue de 0.77. Los potenciales se presentan con referencia al sistema Fc^+/Fc y de acuerdo con la recomendación de los autores, se dispuso que el coeficiente de difusión de $Q^{\cdot-}$ fuera 25% menor que Q y el de Q^{2-} 50%. Todos los voltamperogramas se obtuvieron en dirección catódica y comenzando desde OPC. La simulación con NQ y 5OHNQ en acetonitrilo (ACN) se efectuó como control.

		E° / V	$k_s / cm\ s^{-1}$	K / M^{-1}	$k_f / M^{-1}\ s^{-1}$	$D / cm^2\ s^{-1}$
ec						
NQ 3.74 mM, 0.10 M Bu₄NPF₆ en ACN a 25°C						
1	$NQ + e^- \leftrightarrow NQ^{\cdot-}$	-1.080	0.21			
2	$NQ^{\cdot-} + e^- \leftrightarrow NQ^{2-}$	-1.696	0.06			
3	$2NQ^{\cdot-} \leftrightarrow NQ + NQ^{2-}$			3.9×10^{-11}	0.01	2.64×10^5
5OHNQ (HQ) 4.02 mM, 0.10 M Bu₄NPF₆ en ACN a 25°C						
1	$5OHNQ + e^- \leftrightarrow 5OHNQ^{\cdot-}$	-0.909	0.170			
2	$5OHNQ^{\cdot-} + e^- \leftrightarrow 5OHNQ^{2-}$	-1.411	0.058			
7	$\pi-(5OHNQ)_2^{2-} + e^- \leftrightarrow \pi-(5OHNQ)_2^{\cdot3-}$	-1.312	0.020			
3	$5OHNQ^{\cdot-} + 5OHNQ^{\cdot-} \leftrightarrow 5OHNQ + 5OHNQ^{2-}$			3.3×10^{-9}	0.1	
5	$5OHNQ^{\cdot-} + 5OHNQ^{\cdot-} \rightarrow \sigma-(5OHNQ)_2^{2-}$				20	
6	$5OHNQ^{\cdot-} + 5OHNQ^{\cdot-} \leftrightarrow \pi-(5OHNQ)_2^{2-}$			20	1.0×10^8	2.91×10^5
5OHNQ (HQ) 5.23 mM, 0.10 M Bu₄NPF₆ en DMSO a 25°C						
1	$5OHNQ + e^- \leftrightarrow 5OHNQ^{\cdot-}$	-0.845	3.2×10^{-2}			
9	$5OH_2NQ^+ + e^- \leftrightarrow 5OH_2NQ^{\cdot}$	-0.764	3.0×10^{-4}			
10	$prod + 2e^- \leftrightarrow 5OHNQ^{\cdot-}$	-0.239	3.2×10^{-4}			
2	$5OHNQ^{\cdot-} + e^- \leftrightarrow 5OHNQ^{2-}$	-1.493	1.1×10^{-2}			
7	$\pi-(5OHNQ)_2^{2-} + e^- \leftrightarrow \pi-(5OHNQ)_2^{\cdot3-}$	-1.435	2.5×10^{-2}			
3	$5OHNQ^{\cdot-} + 5OHNQ^{\cdot-} \leftrightarrow 5OHNQ + 5OHNQ^{2-}$			1.1×10^{-11}	0.001	
4	$5OHNQ^{\cdot-} + 5OHNQ^{\cdot-} \leftrightarrow (5OHNQ)_2^{\cdot-}$			26	1.0×10^6	
8	$(5OHNQ)_2^{\cdot-} \leftrightarrow 5OH_2NQ^+ + 5OHNQ^{\cdot-}$			3.3×10^6	0.46	
6	$5OHNQ^{\cdot-} + 5OHNQ^{\cdot-} \leftrightarrow \pi-(5OHNQ)_2^{2-}$			20	1.0×10^8	4.72×10^6

Tabla A1.3. Datos empleados para la simulación de voltamperogramas con DigiElch7.

En la figura A1.2 se presentan los voltamperogramas de NQ y 5OHNQ en ACN obtenidos a diferente v . Se observa que en el caso de NQ, el hecho de incorporar la reacción de desproporción **3** no modifica la forma de los voltamperogramas, pero si tiene un ligero efecto sobre las corrientes de la segunda reducción. Lo mismo se observa en los voltamperogramas experimentales obtenidos en DMSO (véase capítulo 4). En el caso de 5OHNQ se agregaron además las reacciones **5**, **6** y **7** que sugieren la formación de dímeros y su reducción. Algunos autores han demostrado que los radicales aniónicos de algunas quinonas y 1,2-dicetonas cíclicas, pueden sufrir dimerización y generar complejos σ y/o π , cuya presencia y otras reacciones aunque sutiles, pueden ser detectadas por VC.¹⁵⁵ En 5OHNQ, la adición de **5**, **6** y **7** no modifica la forma de los voltamperogramas, pero si las corrientes sobretodo de la primera reducción.

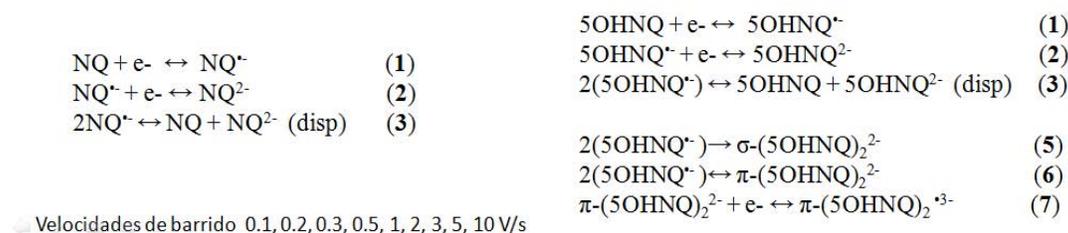
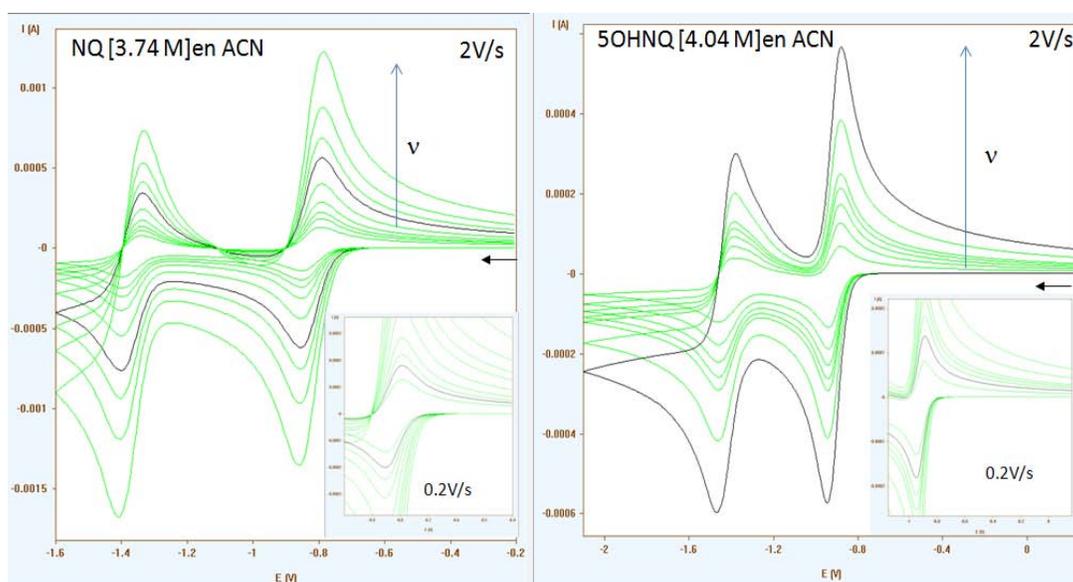
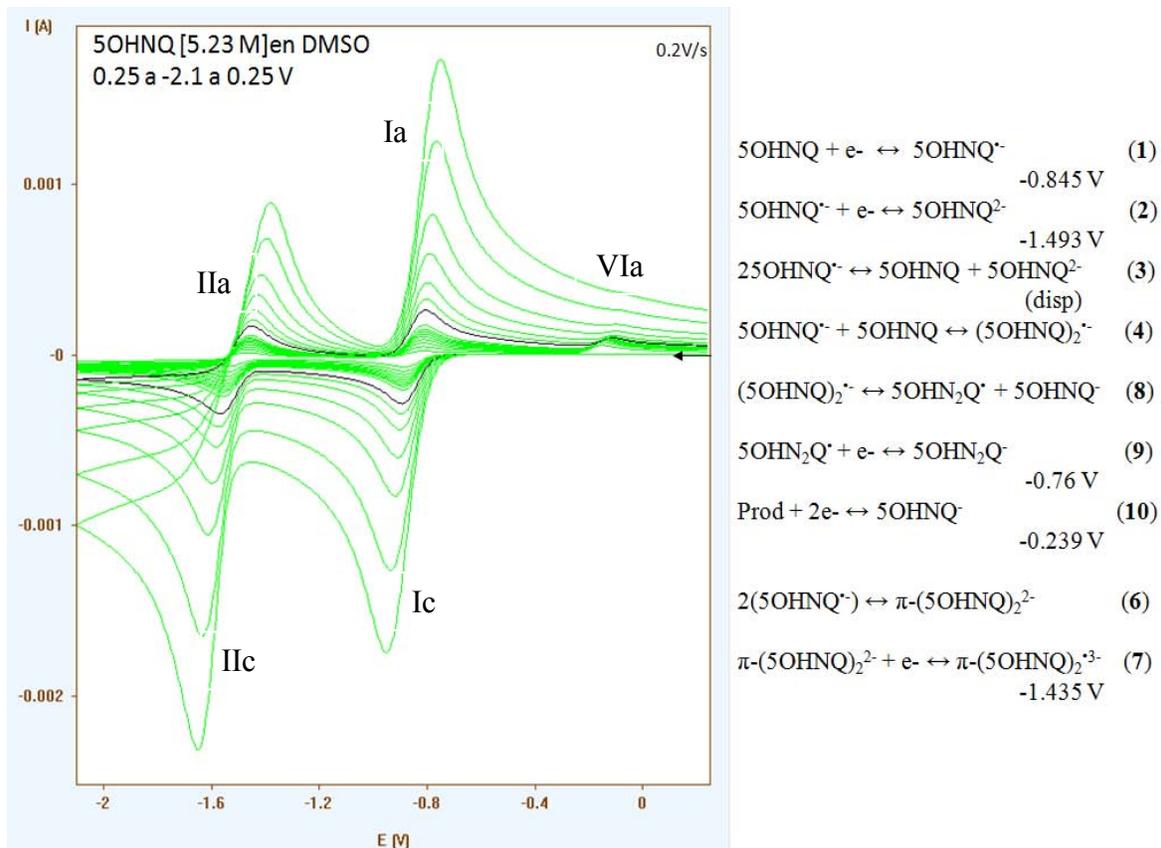


Figura A1.2 Simulación de voltamperogramas de NQ y 5OHNQ en ACN obtenidos a diferente v .

¹⁵⁵ N. Macías-Ruvalcaba; G. Felton; D. Evans. Contrasting behavior in the reduction of 1,2-acenaphthylenedione and 1,2-acanthrylenedione. Two types of reversible dimerization of anion radicals. *J. Phys. Chem. C* (2009) 113, 338-345.

Se realizó la simulación de 5OHNQ en DMSO de la misma forma reportada por Macías-Ruvalcaba (2010). Para ello, se consideraron las reacciones 1-4 y 6-10 ya que a diferencia de ACN, en DMSO la formación de σ -(5OHNQ) $_2^{2-}$ (5) no es importante. Los autores, defienden que la formación de 5OHNQ $^{\cdot-}$ es necesaria para la adecuada similitud con sus experimentos y por lo tanto, se incorporan las reacciones 6 y 7.



Velocidades experimentales 0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1, 2, 3, 5, 10 V/s

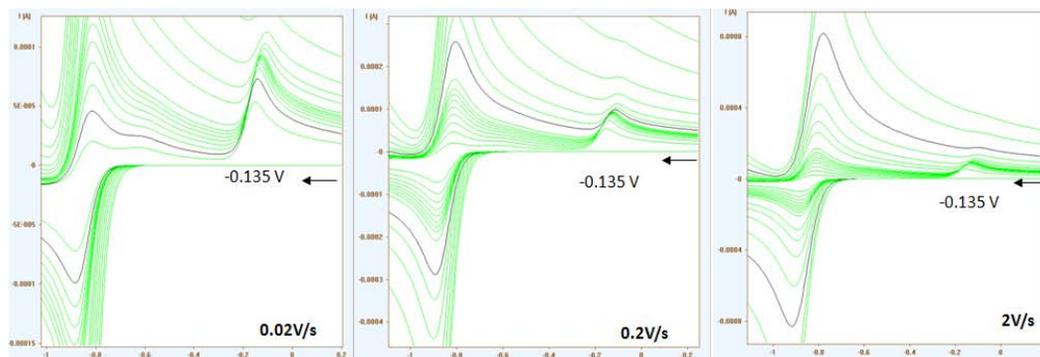


Figura A1.3 Simulación de voltamperogramas de 5OHNQ en DMSO obtenidos a diferente v .

En la figura A1.3, se observa que aparece una pequeña señal de oxidación (VIa) alrededor de -0.1 V, que se vuelve más significativa a bajas ν (figura A1.3, inferior) y concentraciones altas (no se muestran). Los autores, asignan esta señal a la formación de la base conjugada de la 5OHNQ por la reacción **10**. Adicionalmente, se aumentó el barrido del potencial catódico hasta -0.8 V que es aproximadamente el valor de OCP establecido para los experimentos del capítulo 4. En la simulación, se observó una nueva señal de reducción similar a la que se obtiene en los voltamperogramas del mismo capítulo (figura A1.4). Esta señal, tiene un comportamiento parecido a VIa a bajas ν y concentraciones altas (figura A1.4, derecha), lo que sugiere que VIa y esta nueva señal, están relacionadas entre sí. Para verificar lo anterior, se obtuvieron nuevamente los voltamperogramas aumentando el barrido de potencial catódico, pero sin considerar la ecuación **10** (figura A1.5). Los resultados demostraron que ambas señales desaparecen.

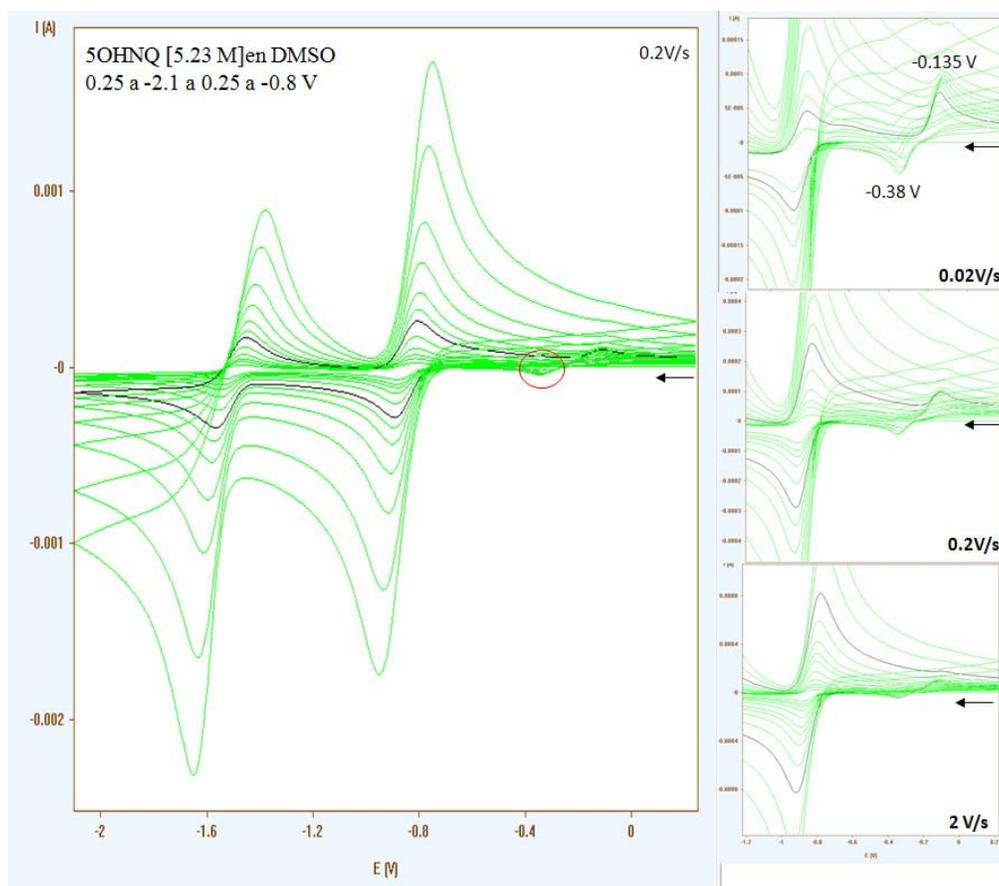


Figura A1.4 Simulación de voltamperogramas de 5OHNQ en DMSO obtenidos a diferente ν aumentando el barrido catódico de regreso hasta -0.8 V

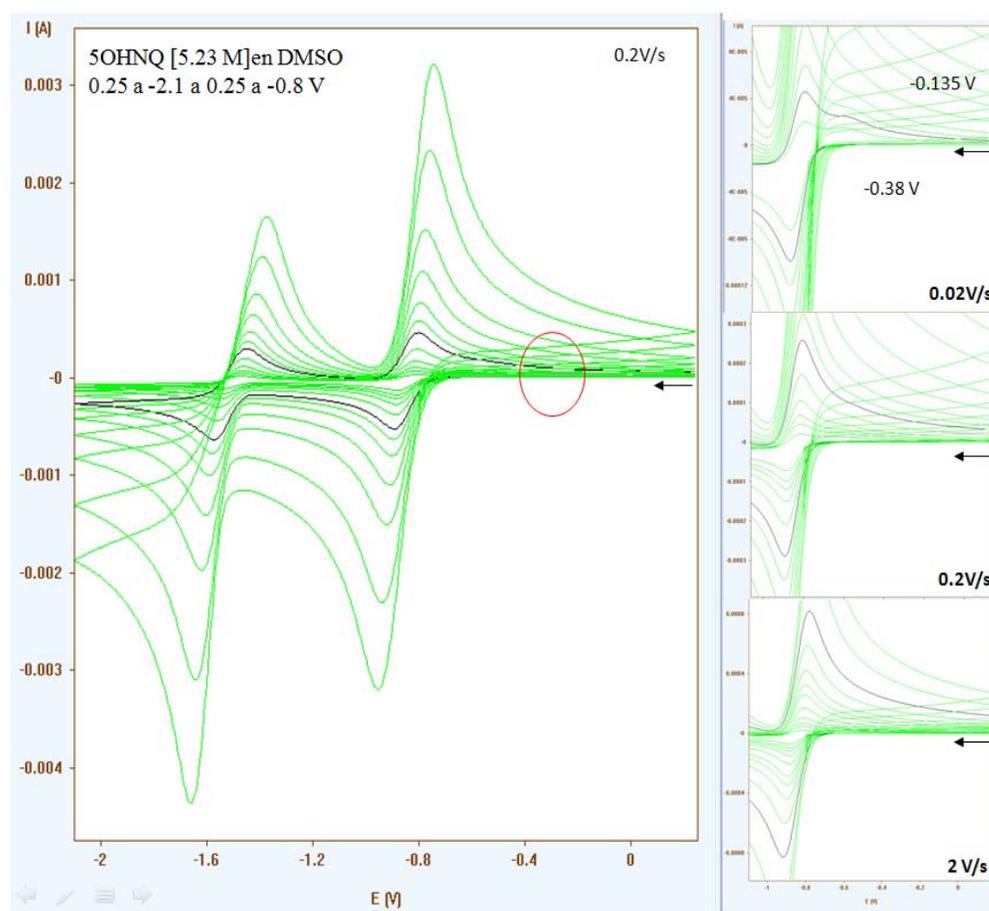


Figura A1.5 Simulación de voltamperogramas de 5OHNQ en DMSO obtenidos a diferente ν aumentando el barrido catódico de regreso hasta -0.8V sin tomar en cuenta la ecuación 10.

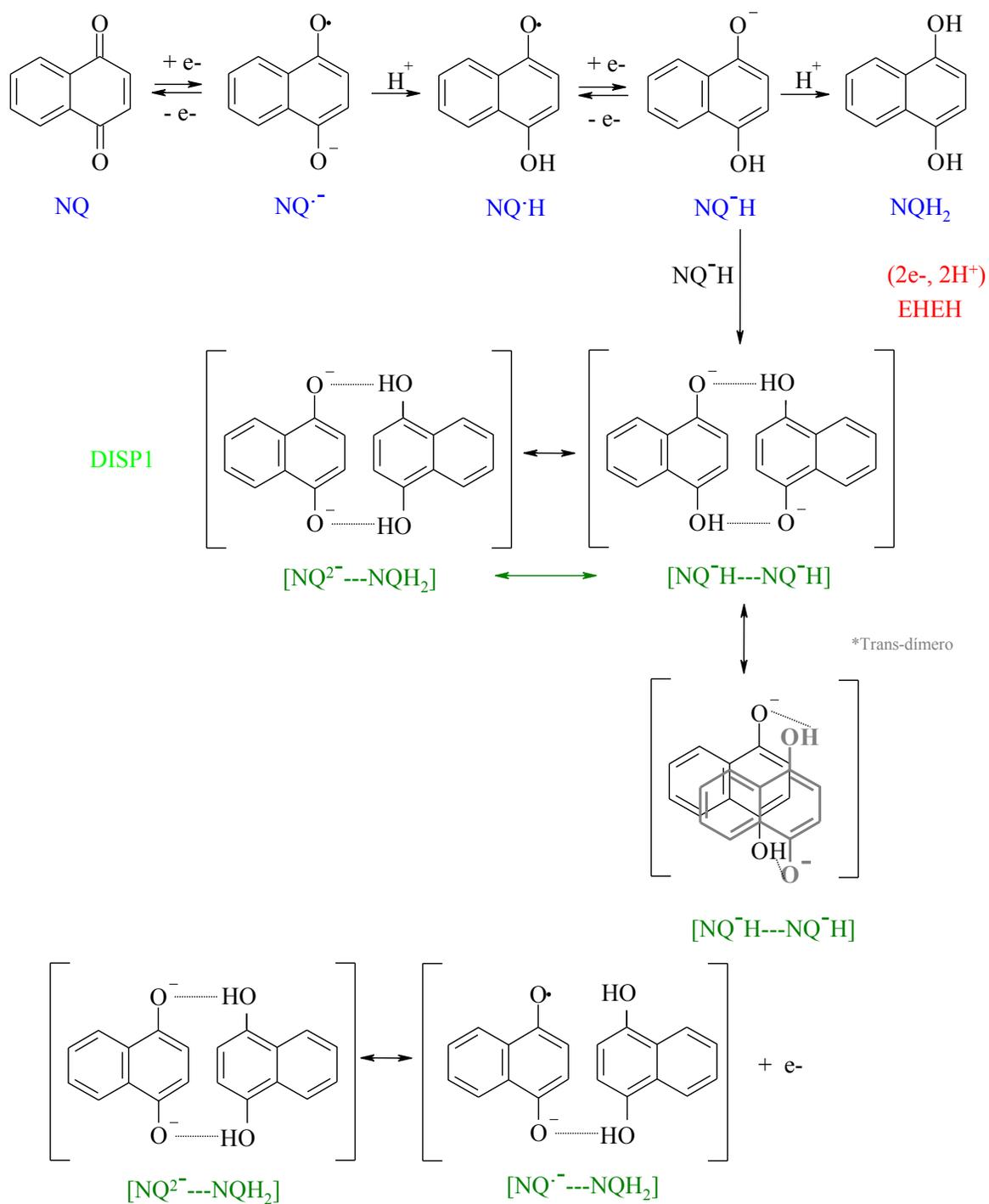
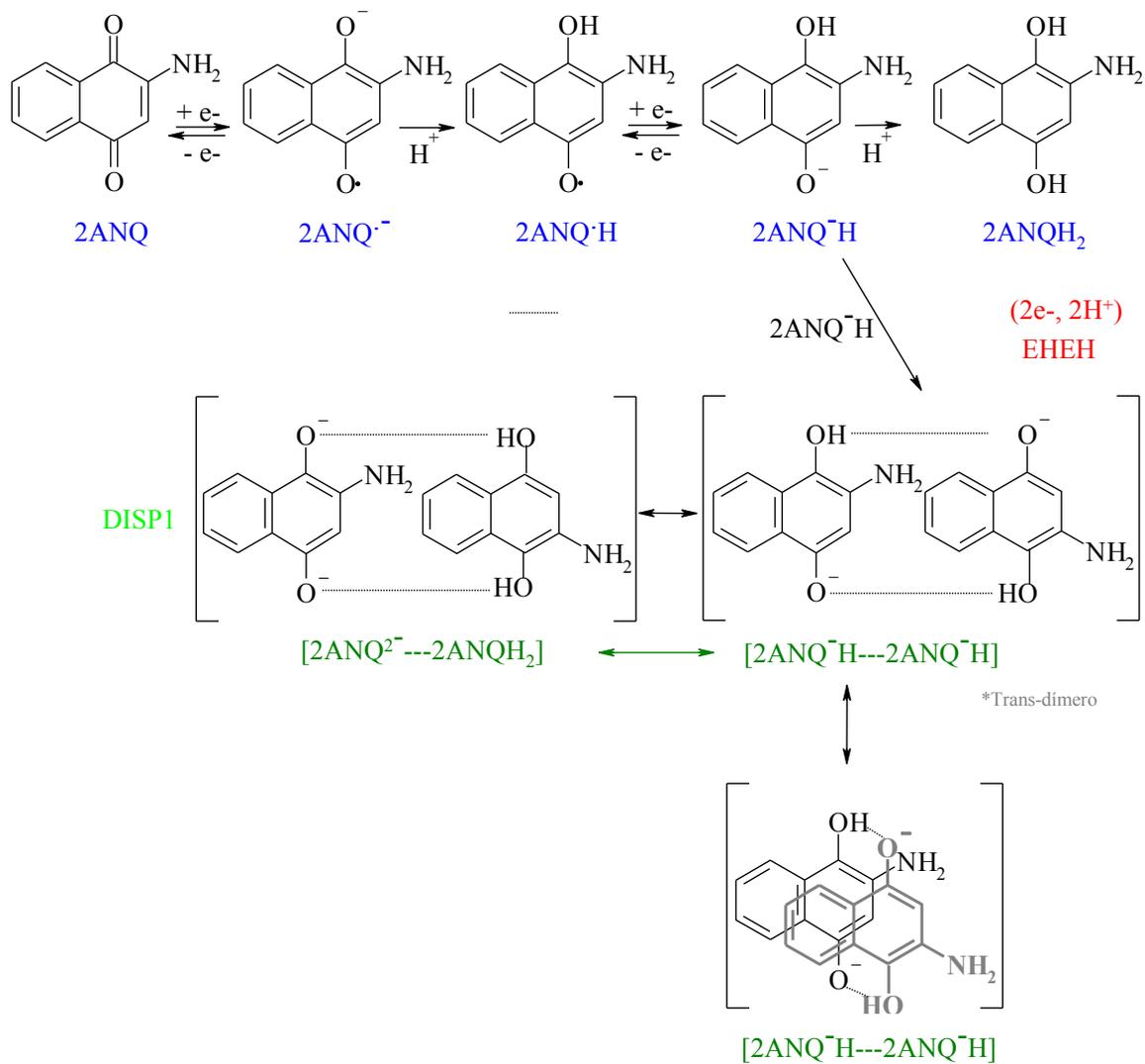


Figura A1.6 Mecanismo de reducción de NQ en ND 96.

	2ANQ	NQ	50HNQ
i_{pa}	$1.31 \times 10^{-5} v^{1/2} - 1.86 \times 10^{-8}$ (0.99) A partir de 200 mV	$1.04 \times 10^{-5} v^{1/2} + 1.73 \times 10^{-7}$ (0.99)	$1.09 \times 10^{-5} v^{1/2} + 4.24 \times 10^{-7}$ (0.99)
i_{pc}	$4.71 \times 10^{-6} v^{1/2} + 4.03 \times 10^{-6}$ (0.98)	$-1.67 \times 10^{-5} v^{1/2} + 1.57 \times 10^{-7}$ (0.99)	$-1.65 \times 10^{-5} v^{1/2} + 2.80 \times 10^{-7}$ (0.99)
E_{pc}	-0.64 mV	-0.45 mV	-0.43 mV
ΔE_{pc}^{NQ}	~200 mV	0 mV	20 mV
$ \Delta E_p $	$0.08 * \text{Log } v + 0.30$ (0.99) A partir de 200 mV	$0.097 * \text{Log } v + 0.327$ (0.99)	$0.051 * \text{Log } v + 0.136$ (0.99)
ΔE_{pa}^v	(+) 76 mV	(+) 150 mV	(+) 60 mV
ΔE_{pc}^v	(-) 52 mV	(-) 47 mV	(-) 44 mV
$ i_{pa}/i_{pc} $	$-0.07 \text{ Log } v + 0.90$ (0.99) A partir de 200 mV	$-0.025 \text{ Log } v + 0.64$ (0.61)	$-0.13 \text{ Log } v + 0.69$ (0.99)
$ i_{pa} * v^{1/2} $	$-2.25 \times 10^{-6} \text{ Log } v + 1.02 \times 10^{-5}$ (0.77) A partir de 200 mV	$-1.84 \times 10^{-7} \text{ Log } v + 1.07 \times 10^{-5}$ (0.36)	$-1.26 \times 10^{-6} \text{ Log } v + 1.13 \times 10^{-5}$ (0.98)
$ i_{pc} * v^{1/2} $	$-7.06 \times 10^{-6} \text{ Log } v + 8.54 \times 10^{-6}$ (0.98)	$-3.40 \times 10^{-7} \text{ Log } v + 1.66 \times 10^{-5}$ (0.69)	$-8.40 \times 10^{-7} \text{ Log } v + 1.63 \times 10^{-5}$ (0.99)
	$7.07 \times 10^{-7} \text{ Log } v + 1.77 \times 10^{-5}$ (0.69) A partir de 200 mV		
	$-1.86 \times 10^{-6} \text{ Log } v + 1.58 \times 10^{-5}$ (0.87)		

Tabla A1.4. Datos electroquímicos de NQs en ND96 (valores representan r²)

Figura A1.7 Mecanismo de reducción de 2NH₂NQ en ND 96.

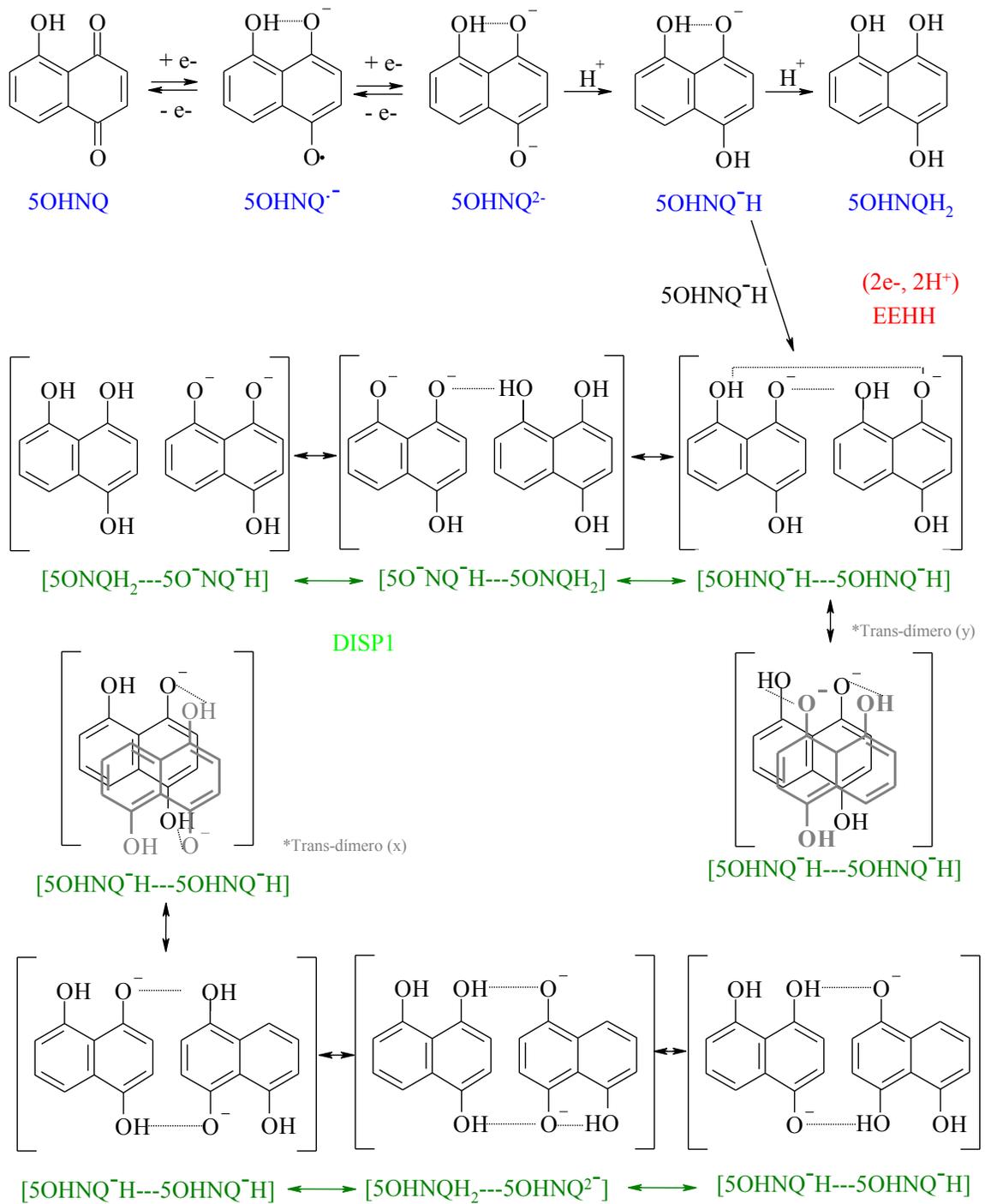


Figura A1.8 Mecanismo de reducción de 5OHNQ en ND 96.

ANEXO 2: ELECTROFISIOLOGÍA

A2.1. Transcripción *in vitro* del RNA de dShIR.

La transcripción, es el primer proceso bioquímico de la expresión genética para la transferencia de información de una secuencia de ADN a una secuencia de ARN como paso inicial para la síntesis de proteínas. Las secuencias de ADN se copian mediante la enzima ARNpolimerasa que sintetiza un ARNmensajero manteniendo la información del ADN; este proceso tiene tres grandes fases: iniciación, elongación y terminación

En la fase de iniciación los factores de transcripción, se unen al promotor (secuencias específicas en el ADN localizados en los extremos 5'-terminal de los genes) para comenzar el proceso de síntesis. La secuencia más conocida, es la caja TATA sobre la que se fija una proteína de unión y los factores de transcripción, formando así un complejo que cuando se abre, da comienzo a la fase de iniciación. En esta fase, una helicasa separa las hebras de ADN formando una burbuja de transcripción y posteriormente, se unen otros factores que permiten el acceso a la ARNpolimerasa al molde de ADN de cadena simple. En la fase de elongación, la ARNpolimerasa se encuentra con la cadena de ADN y cataliza la unión de ribonucleósidos mediante la formación de enlaces fosfodiéster llevando a cabo la elongación de cadena del ARNm. En la fase de terminación, la cadena sintetizada de ARNm se separa completamente del ADN (que recupera su forma original) y también de la ARN polimerasa, finalizando así la transcripción. Esta fase, está señalizada por sitios en la secuencia del ADN ricos en guanina y citocina (situadas en el otro extremo de los genes) seguidos de zonas ricas en timina que cuando se transcribe el ARN recién sintetizado, adopta una estructura en horquilla que desestabiliza el complejo ARN-ADN obligándolo a separarse de la ARN polimerasa.

Pasos realizados:

1. Preparación del molde de ADN: Previo a la transcripción, se preparó y linealizó el ADN de canal Shaker sin bola de inactivación dShIR, que fue proporcionado por Ligia Toro (Escuela de Medicina David Geffen UCLA, USA). Para ello, se emplearon 10 μ L (10 μ g) del plásmido (pcDNA3ShIR) que contenía la secuencia del canal y se digirió con 2 μ L(40U) de la enzima de restricción EcoRI (New England Biolabs). Para la reacción, se adicionaron 4 μ L de solución amortiguadora especial para EcoRI 10x y 24 μ L de H₂O libre de ARNasas tratada con DEPC al 0.05%, H₂O_{DEPC}. La reacción se incubó a 37°C por 2 horas. El DNA linealizado, se precipitó con 100 μ L de etanol frío y 4 μ L de acetato de sodio 3 M (pH 5.2), la mezcla de reacción se dejó a -20°C durante una noche. Finalmente, se centrifugó a máxima velocidad en una microcentrífuga por 15 min y se retiró el sobrenadante. El precipitado se colocó en un concentrador de muestras al vacío sin calentamiento y posteriormente, se resuspendió el DNA precipitado en 10 μ L de H₂O_{DEPC}. La linealización de DNA se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% comprobando que hay una sola banda correspondiente al plásmido digerido¹⁵⁶.
2. Reacción de transcripción: Para la transcripción *in vitro* se utilizó un kit mMessage mMachine con RNA polimerasa T7 (Cat. 1344 Ambion) de acuerdo a las instrucciones especificadas en el manual. Para ello, se colocaron 4 μ L de H₂O_{DEPC}, 10 μ L de NTP/CAP_(nucleótidos) 2x, 2 μ L de amortiguador 10x, 2 μ L (1 μ g) de DNA linealizado y 2 μ L de RNAPolimerasa en riguroso orden. La mezcla de reacción fue homogenizada suavemente con la punta de una micropipeta e incubada a 37°C durante 4 hrs. Una vez finalizada la transcripción, se adicionó 1 μ L de ADNasa para detener la reacción y se centrifugó e incubó a 37°C durante 15min.
3. Recuperación de RNA: Se realizó la precipitación de ARN con 30 μ L de solución de LiCl 7.5 M en EDTA 100 mM y 30 μ L de H₂O_{DEPC}, se mezcló y enfrió a -20°C durante toda la noche. Al siguiente día, la mezcla se descongeló y centrifugó a máxima

¹⁵⁶ Cazares Figueroa I. Tesis de Licenciatura: “Determinación de la actividad de esteroides: progesterona y alopregnanolona sobre canales iónicos de potasio” (2009) Facultad de Química, UNAM, México.

velocidad en una microcentrífuga durante 15 min y se retiró el sobrenadante. El precipitado, se lavó con 1mL de etanol al 70% frío, se centrifugó nuevamente para eliminar al máximo los nucleótidos no incorporados y finalmente se removió el etanol. El residuo se colocó en un concentrador de muestras al vacío sin calentamiento durante 2 min y posteriormente, se resuspendió el RNA en 20 μ L de H₂O_{DEPC} y se guardó a -80°C hasta su posterior uso. El producto de la transcripción se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% comprobando la presencia de una banda principal correspondiente al mRNA de ShIR obtenido.¹⁵⁶ Para su cuantificación, se midió la absorbancia a 260 nm considerando

$$A_{260} * \text{factor de dilución} * 40 = \mu\text{g} / \mu\text{L RNA}$$

se determinó una concentración de 100 μ g/ μ L de mRNA de ShIR.

A2.2. Análisis estadístico: Comparación de medias y varianzas.

Para el análisis estadístico de los datos, se utilizaron las plantillas de “Pruebas de Hipótesis entre Dos Grupos de Datos” del M. en C. Francisco Rojo Callejas. En éstas, se vaciaron los datos de inhibición (sin considerar el porcentaje) utilizando a la NQ como sistema de comparación. La plantilla arroja algunos parámetros estadísticos de interés como media y desviación estándar entre otros, que se muestran en las tablas A2.1A, A2.2A, A2.3A y A2.4A. Como primer análisis, se sugiere realizar las pruebas de hipótesis sobre las varianzas (Tablas A2.1B, A2.2B, A2.3B y A2.4B) para verificar si los datos pueden o no compararse. En todos los casos, se acepta la hipótesis nula ($H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$) y se prosigue a la comparación de medias.

Cuando se verifica la hipótesis nula de comparación de medias ($H_0: \mu_1 = \mu_2$), en las tablas A2.1C, A2.2C, A2.4C pueden observarse que en todos los casos ésta se rechaza con riesgo de equivocarse menor al 3%; lo que sugiere que el efecto entre NQs es diferente en ambos canales. En el caso de 5OHNQ en dShIR (tabla A2.3C) la comparación de medias no es estadísticamente significativa (es decir, se acepta $H_0: \mu_1 = \mu_2$), lo que sugiere que el efecto que produce 5OHNQ y NQ en dShIR es igual.

A2.2.1 NQ vs 5OHNQ (rKv1.3)

A) Parámetros estadísticos		
Riesgo=	5%	
	NQ	5OHNQ
No de datos	6	6
Media	0.174	0.238
Incertidumbre	+0.019	+0.031
Desv. Std.	0.011	0.034
Coef Variación	6.768	4.471
T de student	3.182	12.706
Varianza	0.000138	0.00118

B) Hipótesis sobre varianzas		Riesgo $\alpha = 0.05$		$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$
Varianza estimada de	NQ	0.00138		
Varianza estimada de	5OHNQ	0.00118		
Hipótesis alternas	F de Snedecor	F de tablas	Resultado	Decisión
$H_1: \sigma_1^2 < \sigma_2^2$	8.558	10.127	igual	Aceptar H_0
$H_2: \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$	8.558	17.443	igual	Aceptar H_0

C) Hipótesis sobre medias		Riesgo $\alpha=0.05$		$H_0: \mu_1 = \mu_2$
Media estimada de	NQ	0.174		
Media estimada de	5OHNQ	0.238		
Hipótesis alternas	t de student	t de tablas	Resultado	Decisión
$H_1: \mu_1 < \mu_2$	-3.696	-2.131	inferior	Rechazar $H_0 \alpha=0.0104$
$H_2: \mu_1 \neq \mu_2$	-3.696	2.776	diferente	Rechazar $H_0 \alpha=0.0209$

Tabla A2.1. Análisis estadístico de NQ vs 5OHNQ en rKv1.3

A2.2.2. NQ vs 2NH₂HNQ (rKv1.3)

A) Parámetros estadísticos		
Riesgo=	5%	
	NQ	2NH₂NQ
No de datos	6	6
Media	0.174	0.047
Incertidumbre	+0.019	+0.016
Desv. Std.	0.011	0.018
Coef Variación	6.768	9.024
T de student	3.182	4.302
Varianza	0.000138	0.000342

B) Hipótesis sobre varianzas		Riesgo $\alpha=0.05$		$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$
Varianza estimada de	NQ	0.00138		
Varianza estimada de	2NH₂NQ	0.000342		
Hipótesis alternas	F de Snedecor	F de tablas	Resultado	Decisión
$H_1: \sigma_1^2 < \sigma_2^2$	2.469	9.552	igual	Aceptar H_0
$H_2: \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$	2.469	16.044	igual	Aceptar H_0

C) Hipótesis sobre medias		Riesgo $\alpha=0.05$		$H_0: \mu_1 = \mu_2$
Varianza estimada de	NQ	0.174		
Varianza estimada de	2NH₂NQ	0.047		
Hipótesis alternas	t de student	t de tablas	Resultado	Decisión
$H_1: \mu_1 > \mu_2$	11.167	2.015	mayor	Rechazar $H_0 \alpha=5.022E-5$
$H_2: \mu_1 \neq \mu_2$	11.167	2.570	diferente	Rechazar $H_0 \alpha=0.0001$

Tabla A2.2. Análisis estadístico de NQ vs 2NH₂NQ en rKv1.3**A2.2.3. NQ vs 5OHNQ (dShIR)**

A) Parámetros estadísticos		
Riesgo=	5%	
	NQ	5OHNQ
No de datos	6	6
Media	0.038	0.029
Incertidumbre	+0.0031	+0.0042
Desv. Std.	0.012	0.016
Coef Variación	3.297	5.861
T de student	4.302	4.302
Varianza	0.000152	0.000287

B) Hipótesis sobre varianzas		Riesgo $\alpha=0.05$		$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$
Varianza estimada de	NQ	0.000152		
Varianza estimada de	5OHNQ	0.000287		
Hipótesis alternas	F de Snedecor	F de tablas	Resultado	Decisión
$H_1: \sigma_1^2 < \sigma_2^2$	1.881	19	igual	Aceptar H_0
$H_2: \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$	1.881	39	igual	Aceptar H_0

C) Hipótesis sobre medias		Riesgo $\alpha=0.05$		$H_0: \mu_1 = \mu_2$
Media estimada de	NQ	0.0375		
Media estimada de	5OHNQ	0.0289		
Hipótesis alternas	t de student	t de tablas	Resultado	Decisión
$H_1: \mu_1 > \mu_2$	0.706	2.131	igual	Aceptar H_0
$H_2: \mu_1 \neq \mu_2$	0.706	2.776	igual	Aceptar H_0

Tabla A2.3. Análisis estadístico de NQ vs 5OHNQ en dShIR

A2.2.4. NQ vs 2NH₂HNQ (dShIR)

A) Parámetros estadísticos		
Riesgo=	5%	
	NQ	2NH₂NQ
No de datos	6	6
Media	0.038	0.088
Incertidumbre	+0.0031	+0.0022
Desv. Std.	0.012	0.0090
Coef Variación	3.297	1.015
T de student	4.302	4.302
Varianza	0.000152	0.000813

B) Hipótesis sobre varianzas		Riesgo $\alpha=0.05$		$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$
Varianza estimada de	NQ	0.000152		
Varianza estimada de	2NH₂NQ	0.000813		
Hipótesis alternas	F de Snedecor	F de tablas	Resultado	Decisión
$H_1: \sigma_1^2 < \sigma_2^2$	5.392	19	igual	Aceptar H_0
$H_2: \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$	5.392	39	igual	Aceptar H_0

C) Hipótesis sobre medias		Riesgo $\alpha=0.05$		$H_0: \mu_1 = \mu_2$
Varianza estimada de	NQ	0.0375		
Varianza estimada de	2NH₂NQ	0.0887		
Hipótesis alternas	t de student	t de tablas	Resultado	Decisión
$H_1: \mu_1 < \mu_2$	-7.162	-2.131	inferior	Rechazar H_0 $\alpha=0.0039$
$H_2: \mu_1 \neq \mu_2$	-7.162	4.302	diferente	Rechazar H_0 $\alpha=0.0189$

Tabla A2.4. Análisis estadístico de NQ vs 2NH₂NQ en dShIR

ANEXO 3:

ESTUDIOS DE MODELADO Y ACOPLAMIENTO MOLECULAR

A3.1. Modelado por Homología de monómeros.

Previo al modelado por homología, se compararon las secuencias de aa proporcionadas con las reportadas con el fin de verificar sus identidades para una adecuada discusión de los resultados. El ADN de rKv1.3 utilizado para los ensayos EF, fue donado por el Professor Olaf Pongs (University-Hospital Eppendorf, Alemania) al igual que la secuencia primaria que fue publicada por su grupo de trabajo en 1989. Esta secuencia, presenta una identidad de 524/525 aa (excepto por L106F) con la informada en la base de datos del NCBI con el número de acceso NP_062143.3 (Figura A3.1). Por otra parte, el ARNc obtenido del ADN de dShIR proporcionado por Ligia Toro (Escuela de Medicina David Geffen UCLA, USA), presenta una identidad de 654/655 aa (excepto por la inserción V472ins como en la isoforma E del Shaker sin dominio de inactivación con $\Delta 6-46$) con la secuencia con número de acceso NP_728123.1 (Figura A3.2). De forma paralela, la secuencia reportada por Olaf Pongs para el rKv1.3 se comparó con la reportada por Grissmer para hKv1.3 con número de acceso NP_002223.3 (Figura A3.3), las cuales presentaron una identidad 509/525 aa (considerando que aarKv1.3-aahKv1.3, A14-V66, G16-D68, G20-A72, D21- $\Delta 73$, V28- $\Delta 78$, D29-S79, A42-S92 y adición 50 aa en dominio N-terminal; P219-T269, V223-S273, N228-G278, A234-S284, S235-R285 y S236-A286 en el A1; S375-T425, N379-S429 en P y finalmente A447-S497 en dominio C-terminal).

A3.1.1

Comparación de secuencias de rKv1.3 reportada en la base de datos del NCBI con el número de acceso NM:019270.3 (secuencia aa NP_062143.3) y la secuencia de rKv1.3 proporcionada por Professor Olaf Pongs con la que se realizaron los ensayos EF. Donde “Seq_Nucleotidos_Kv13r_enviad” se refiere a la proporcionada por Professor Olaf Pongs mientras que “Kv1.3r_NM_019270.3_nucleotid” representa a la secuencia con que se encontró correspondencia. Estas secuencias, presentan una identidad de 524/525 nucleótidos (excepto por L106F) con la informada en la base de datos del NCBI con el número de acceso NP_062143.3.¹⁵⁷

```

Seq_Nucleotidos_Kv13r_enviad      GCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATT
Kv1.3r_NM_019270.3_nucleotid      -----

Seq_Nucleotidos_Kv13r_enviad      TAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCC
Kv1.3r_NM_019270.3_nucleotid      -----

Seq_Nucleotidos_Kv13r_enviad      ACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATA
Kv1.3r_NM_019270.3_nucleotid      -----

Seq_Nucleotidos_Kv13r_enviad      GCGGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGGTTTCGGTGATGACGGTGAA
Kv1.3r_NM_019270.3_nucleotid      -----

Seq_Nucleotidos_Kv13r_enviad      AACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGC
Kv1.3r_NM_019270.3_nucleotid      -----

Seq_Nucleotidos_Kv13r_enviad      GGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCG
Kv1.3r_NM_019270.3_nucleotid      -----

Seq_Nucleotidos_Kv13r_enviad      GGTGTGGGGCTGGCTTAAGTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGA
Kv1.3r_NM_019270.3_nucleotid      -----

Seq_Nucleotidos_Kv13r_enviad      GTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATA
Kv1.3r_NM_019270.3_nucleotid      -----

Seq_Nucleotidos_Kv13r_enviad      CCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGC
Kv1.3r_NM_019270.3_nucleotid      -----

Seq_Nucleotidos_Kv13r_enviad      GATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGT
Kv1.3r_NM_019270.3_nucleotid      -----

Seq_Nucleotidos_Kv13r_enviad      GCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACG
Kv1.3r_NM_019270.3_nucleotid      -----

Seq_Nucleotidos_Kv13r_enviad      TTGTAACGACGCGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGCGGAAT
Kv1.3r_NM_019270.3_nucleotid      -----

Seq_Nucleotidos_Kv13r_enviad      TAATTCGAGCTCGGTACCCAGCTTGCTTGTCTTTTTGCAGAAGCTCAGA
Kv1.3r_NM_019270.3_nucleotid      -----

Seq_Nucleotidos_Kv13r_enviad      ATAAACGCTCA-ACTTTGGCAGATCA--ATTCGCCGGGGATCCCAATTC
Kv1.3r_NM_019270.3_nucleotid      -----

```

¹⁵⁷ Stühmer, W.; Ruppersberg, J.; Schröter, K.; Sakmann, B.; Stocker, M.; Giese, K.; Perschke, A.; Baumann, A.; Pongs, O. Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian, *EMBO J.* 8 (1989) 3235–3244.

Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid	ACTCGAGACGC-GCCAGACATGACCGTGGTGCCCGGGGACCACCTGCTGG -----ATGACCGTGGTGCCCGGGGACCACCTGCTGG
Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid	AGCCAGAAGCGGCGGGAGGCGGCGGGGACCCGCCTCAGGGAGGCTGT AGCCAGAAGCGGCGGGAGGCGGCGGGGACCCGCCTCAGGGAGGCTGT
Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid	GTCAGTGGCGGGCTGCGACCGCTACGAACCGCTGCCGCCCGCTGCC GTCAGTGGCGGGCTGCGACCGCTACGAACCGCTGCCGCCCGCTGCC
Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid	CGCGCGGGGCGAGCAGGATTGCTGCGGGGAGCGCGTGGTTCATCAACATCT CGCCCGGGGCGAGCAGGATTGCTGCGGGGAGCGCGTGGTTCATCAACATCT
Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid	CCGGGCTGCGCTTCGAGACACAGCTCAAGACCCTCTGCCAGTTCCTTGAG CCGGGCTGCGCTTCGAGACACAGCTCAAGACCCTCTGCCAGTTCCTTGAG
Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid	ACGCTGCTAGGCGACCCCAAGCGGCGCATGCGGTACTTCGACCCGCTCCG ACGCTGCTAGGCGACCCCAAGCGGCGCATGCGGTACTTCGACCCGCTCCG
Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid	CAATGAGTACTTCTTCGACCGCAACAGACCCAGCCTCGACGCCATCCTCT CAATGAGTACTTCTTTCGACCGCAACAGACCCAGCTTCGACGCCATCCTCT
Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid	ACTACTACCAGTCCGGGGGCGCATCCGCCGGCCGTCACAGTGCACATC ACTACTACCAGTCCGGGGGCGCATCCGCCGGCCGTCACAGTGCACATC
Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid	GACATCTTCTCCGAGGAGATCCGCTTCTACCAACTGGGTGAGGAGGCTAT GACATCTTCTCCGAGGAGATCCGCTTCTACCAACTGGGTGAGGAGGCTAT
Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid	GGAGAAGTTCGGTGGAGACGAGGGCTTCCTGCGGGAGGAGGAGCGACCCC GGAGAAGTTCGGTGGAGACGAGGGCTTCCTGCGGGAGGAGGAGCGACCCC
Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid	TGCCCCGCCGTGACTTCCAGCGCCAGGTGTGGCTGCTCTTCCAATACCCC TGCCCCGCCGTGACTTCCAGCGCCAGGTGTGGCTGCTCTTCCAATACCCC
Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid	GAGAGTCCGGGCCGCCCCGGGCATTGCCATCGTGTGCTGCTGGTTCAT GAGAGTCCGGGCCGCCCCGGGCATTGCCATCGTGTGCTGCTGGTTCAT
Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid	TCTCATCTCCATTGTCATCTTCTGCTTGGAGACTACCCGAGTTTCGCG TCTCATCTCCATTGTCATCTTCTGCTTGGAGACTACCCGAGTTTCGCG
Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid	ACGAGAAGGACTATCCCGCCTCTCCGTCGCAGGACGTGTTTGGGCTGCC ACGAGAAGGACTATCCCGCCTCTCCGTCGCAGGACGTGTTTGGGCTGCC
Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid	AACAACAGCACGTCCGGGGCCTCCTTGGAGCCTCCAGCTTCTCGGACCC AACAACAGCACGTCCGGGGCCTCCTTGGAGCCTCCAGCTTCTCGGACCC
Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid	CTTCTTCGTAGTGGAGACCCTGTGCATCATCTGGTTCTCCTTTGAGCTGC CTTCTTCGTAGTGGAGACCCTGTGCATCATCTGGTTCTCCTTTGAGCTGC
Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid	TGGTGCATTTCTTTGCTTGCCCCAGTAAAGCCACCTTCTCCAGAAATATC TGGTGCATTTCTTTGCTTGCCCCAGTAAAGCCACCTTCTCCAGAAATATC
Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid	ATGAACCTGATAGACATTGTAGCCATCATCCCTTATTTTATTACTCTGGG ATGAACCTGATAGACATTGTAGCCATCATCCCTTATTTTATTACTCTGGG
Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid	CACTGAGCTGGCTGAGCGACAGGGTAATGGGCAGCAGGCTATGTCACTGG CACTGAGCTGGCTGAGCGACAGGGTAATGGGCAGCAGGCTATGTCACTGG
Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid	CCATCTGAGGGTTCATCCGCTAGTAAGGGTCTTCCGCATCTTCAAGCTC CCATCTGAGGGTTCATCCGCTAGTAAGGGTCTTCCGCATCTTCAAGCTC
Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid	TCCCGCCATTCTAAGGGGCTGCAGATCCTGGGACAGACTGAAGGCTTC TCCCGCCATTCTAAGGGGCTGCAGATCCTGGGACAGACTGAAGGCTTC
Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid	CATGCGAGAGCTGGGGCTGCTCATTTTCTCCTTTTCATTGGGGTCATCC CATGCGAGAGCTGGGGCTGCTCATTTTCTCCTTTTCATTGGGGTCATCC
Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid	TTTTTCTCAGTGCAGTCTACTTTGCTGAGGCAGACGACCCTTCTCGGGT TTTTTCTCAGTGCAGTCTACTTTGCTGAGGCAGACGACCCTTCTCGGGT

```
Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad      TTTAACAGTATCCCGGATGCCTTCTGGTGGGCCGTGGTAACCATGACAAC
Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid      TTTAACAGTATCCCGGATGCCTTCTGGTGGGCCGTGGTAACCATGACAAC

Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad      TGTCGGTTATGGTGATATGCACCCAGTGACCATAGGAGGCAAGATTGTGG
Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid      TGTCGGTTATGGTGATATGCACCCAGTGACCATAGGAGGCAAGATTGTGG

Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad      GCTCTCTTTGTGCCATCGCAGGTGTCTTGACCATTGCATTGCCGGTTCCCT
Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid      GCTCTCTTTGTGCCATCGCAGGTGTCTTGACCATTGCATTGCCGGTTCCCT

Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad      GTGATTGTTTCCAACCTCAATTACTTCTACCACCGGGAGACAGAAGGGGA
Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid      GTGATTGTTTCCAACCTCAATTACTTCTACCACCGGGAGACAGAAGGGGA

Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad      AGAGCAAGCCCAGTACATGCACGTGGGAAGCTGCCAGCACCTCTCTCTTT
Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid      AGAGCAAGCCCAGTACATGCACGTGGGAAGCTGCCAGCACCTCTCTCTTT

Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad      CAGCAGAGGAGCTCCGAAAAGCCCGGAGTAACTCCACTCTGAGTAAAGTCG
Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid      CAGCAGAGGAGCTCCGAAAAGCCCGGAGTAACTCCACTCTGAGTAAAGTCG

Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad      GAGTATATGGTGATCGAAGAGGGGGTATGAACCACAGCGCCTTCCCCCA
Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid      GAGTATATGGTGATCGAAGAGGGGGTATGAACCACAGCGCCTTCCCCCA

Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad      GACCCCTTCAAAAACGGGCAACTCCACTGCCACTTGCACCACCAACAATA
Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid      GACCCCTTCAAAAACGGGCAACTCCACTGCCACTTGCACCACCAACAATA

Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad      ATCCCAACTCCTGTGTCAACATCAAAAAGATATTCACTGATGTCTAATAG
Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid      ATCCCAACTCCTGTGTCAACATCAAAAAGATATTCACTGATGTCTAATAG

Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad      ATGATACGATTGCCATTCTGTGCCAGTATTGTGTGGAACATGCCCCCTT
Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid      -----

Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad      GGTCTGTGTATGCCCTTGATTTATACATTCCAGACCATTCATCAAGGAA
Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid      -----

Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad      AGTACATGAAGAAGTGAAAAGCACACTTCATTCTCCCTCTCCCTATTGC
Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid      -----

Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad      TTCATACTGAAACAGGTGCCTGGTTTTGCAAGTGGGCTGCATTCTCTCAG
Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid      -----

Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad      CTCTTTTTCTCTCTCCCTCTCTCTCCCTGTTTCTTAATTTTGTGAACA
Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid      -----

Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad      ACAAACTTACATTAAGCTTGGTTTTCTGTGCAAGCCCTA-----AA
Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid      -----

Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad      GC--TACATCCTGAGAGGAAATGAAACTATAGA---GTCAGAGTAACTGT
Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid      -----

Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad      GTGACCTCAAAAATCAAAAGATAGTTGTTTCTTTACTAAGTAAAGGAGGC
Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid      -----

Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad      AGAACTTAAATGATGCTCCTGTTCCGGTGGACTTTTCAGCATTATTTCTG
Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid      -----

Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad      ACTAAGTGT---AACTACTTAACCTCTGGATGTGTGGGTGGAAAGTCTAA
Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid      -----

Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad      CTAGAGTGTGACGTGTAACCCTCTATAATTTTTTTTTTTTTTGGACTGG
Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid      -----

Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad      CCTTTCAGTTTGA-TCTCCCTCTAAGAATTCAGGT--TCACATAACTT
Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid      -----

Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad      TGAACCAAAGGGAAATGCCCAAATGTCCTGATCTGACTA-----TTA
Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid      -----

Seq_Nucleotidos_Kvl3r_enviad      ACTCTTCGGAGTTTGCAAAGCATTTTGAAAACATTAGAC--ACAGATTCC
Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid      -----
```

```

Seq_Nucleotidos_Kv13r_enviad      AATGAAGTTGTGAGTTCATGCCCAAGTC--AATATCTACGAAAGTCTAGA
Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid     -----

Seq_Nucleotidos_Kv13r_enviad      TCTAGAGCAAGCTTGATCTGGTT---ACCACTAAACCAGCCTCAAGAACA
Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid     -----

Seq_Nucleotidos_Kv13r_enviad      CCCGAATGGAGTCTCTAAGCTACATAATACCAACTTACACTTTACAAA-A
Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid     -----

Seq_Nucleotidos_Kv13r_enviad      TGTTGTCCCCCAAATGTAGCCATTCGTATCTGCTCCTAATAAAAAGAAA
Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid     -----

Seq_Nucleotidos_Kv13r_enviad      GTTCTTCACATT--CTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid     -----

Seq_Nucleotidos_Kv13r_enviad      AACCCCCCCCCCCCCCTGCAGGCA-TGCAAGCTA-GCGCCGCACTAG
Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid     -----

Seq_Nucleotidos_Kv13r_enviad      TCGACAGGCC-----
Kvl.3r_NM_019270.3_nucleotid     -----

```

Figura A3.1. Análisis comparativo de secuencias de nucleótidos del canal rKv1.3, NM:019270.3 reportada en NCBI y la secuencia proporcionada por Professor Olaf Pongs.

A3.1.2

Análisis comparativo de secuencias de aa de dShIR utilizado en EF (“Query”) y la secuencia reportada en NCBI con el número de acceso NP_728123.1 (“Sbjct”). El ARNc obtenido del ADN proporcionado por Ligia Toro (Escuela de Medicina David Geffen UCLA, USA) tiene una identidad de 654/655 aa (excepto por la inserción V472ins-enmarcada en negro- como en la isoforma E del Shaker sin dominio de inactivación con $\Delta 6-46$) con la secuencia con número de acceso NP_728123.1.¹⁵⁸

```
ref|NP_728123.1| Shaker, Isoform E [Drosophila melanogaster]
Length=655
GENE ID: 32780 Sh | Shaker [Drosophila melanogaster] (Over 100 PubMed links)
Score = 1082 bits (2799), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 609/610 (99%), Positives = 609/610 (99%), Gaps = 1/610 (0%)

Query 6 LREQQLQRNSLDGYGSLPKLSSQDEEGGAGHGFGGGPQHFEPIPHDHDFCERVVINVSGL 65
Sbjct 47 LREQQLQRNSLDGYGSLPKLSSQDEEGGAGHGFGGGPQHFEPIPHDHDFCERVVINVSGL 106

Query 66 RFETQLRRTLNFQFDPTLLGDPARRRLRYFDPLRNEYFFDRSRPSFDAILYYYQSGGRLRRPV 125
Sbjct 107 RFETQLRRTLNFQFDPTLLGDPARRRLRYFDPLRNEYFFDRSRPSFDAILYYYQSGGRLRRPV 166

Query 126 NVPLDVFSEEEKFYELGDQAINKREDEGFIKEEERPLPDNEKQRKVWLLFEYPSSQAA 185
Sbjct 167 NVPLDVFSEEEKFYELGDQAINKREDEGFIKEEERPLPDNEKQRKVWLLFEYPSSQAA 226

Query 186 RVVAIIISVVFVILLSIVIFCLETLPEFKHYKVFNTTNGTKIEEDEVDPDITDPFFLIETLC 245
Sbjct 227 RVVAIIISVVFVILLSIVIFCLETLPEFKHYKVFNTTNGTKIEEDEVDPDITDPFFLIETLC 286

Query 246 IIWFTFELTVRFLACPNKLNFCRDVMNVIDIIAIIPIYFITLATVVAEEEDTLNLPKAPVS 305
Sbjct 287 IIWFTFELTVRFLACPNKLNFCRDVMNVIDIIAIIPIYFITLATVVAEEEDTLNLPKAPVS 346

Query 306 PQDKSSNQAMSLAILRVIRLVRFRIFKLSRHSKGLQILGRTLKASMRELGLLIFFLFIG 365
Sbjct 347 PQDKSSNQAMSLAILRVIRLVRFRIFKLSRHSKGLQILGRTLKASMRELGLLIFFLFIG 406

Query 366 VVLFSSAVYFAEAGSENSFFKSI PDFAFWAVVTMTTVGYGDMTPVGVMGKIVGSLCAIAG 425
Sbjct 407 VVLFSSAVYFAEAGSENSFFKSI PDFAFWAVVTMTTVGYGDMTPVGVMGKIVGSLCAIAG 466

Query 426 VLTIALPVPVIVSNFNFYFHRETDQEEMQSQNFNHVTSCPYPGLT[V]GQHMKKSLSSESS 485
Sbjct 467 VLTIALPVPVIVSNFNFYFHRETDQEEMQSQNFNHVTSCPYPGLT-GQHMKKSLSSESS 525

Query 486 SDMDLDDGVESTPGLTETHPGRSAVAPFLGAQQQQQPVASSLMSIDKQLQHPLQQLT 545
Sbjct 526 SDMDLDDGVESTPGLTETHPGRSAVAPFLGAQQQQQPVASSLMSIDKQLQHPLQQLT 585

Query 546 QTQLYQQQQQQQQQQNGFKQQQQQTQQQLQQQQSHTINASAAAATSGSGSSGLTMRHNN 605
Sbjct 586 QTQLYQQQQQQQQQQNGFKQQQQQTQQQLQQQQSHTINASAAAATSGSGSSGLTMRHNN 645

Query 606 ALAVSIETDV 615
Sbjct 646 ALAVSIETDV 655
```

Figura A3.2. Análisis comparativo de secuencias NP_728123.1 de dShIR y la proporcionada por Ligia Toro

¹⁵⁸ a) Hoshi, T.; Zagotta, W.; Aldrich, R. Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation, *Science* 250 (1990) 533–538.
b) Zagotta, W.; Hoshi, T.; Aldrich, R. Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB, *Science* 250 (1990) 568–571.

A3.1.3

Análisis comparativo de secuencias de rKv1.3 utilizado en EF y la secuencia de hKv1.3 reportada por Grissmer con el número de acceso NP_002223.3¹⁵⁹. Las secuencias presentan algunas diferencias (enmarcadas en negro), sin embargo estas no son relevantes para las conclusiones a las que llega este trabajo. A continuación se enlistan las observaciones realizadas:

- La identidad de las secuencias es del 98% ya que aunque se trata del mismo canal la especie de procedencia es distinta. En un total de 525 aa se encontraron 16 modificaciones
- El canal hKv1.3 presenta 50 aa adicionales en el dominio N-terminal. En este, se encontraron a su vez siete diferencias (aarKv1.3-aahKv1.3) A14-V66, G16-D68, G20-A72, D21-Δ73, V28-Δ78, D29-S79 y A42-S92.
- En A1 se encontraron seis modificaciones (aarKv1.3-aahKv1.3) P219-T269, V223-S273, N228-G278, A234-S284, S235-R285 y S236-A286.
- En el vestíbulo del P se encontraron dos modificaciones (aarKv1.3-aahKv1.3) S375-T425 y N379-S429
- En el dominio C-terminal sólo se encontró una modificación (aarKv1.3-aahKv1.3) A447-S497.

Al comparar rKv1.3 y dShIR, mostraron un 75 % de identidad esto era de esperarse ya que ambos canales pertenecen a la misma familia Kv1.x. Sin embargo, en los ensayos EF con rKv1.3 y dShIR, se observaron diferencias de actividad cuando fueron expuestos a la NQ. Esto sugiere que, la modulación de estos canales debe ocurrir de manera fina y en sitios específicos del canal. Finalmente, las secuencias (rKv1.3 y dShIR) se sometieron a un análisis por BLAST en línea para encontrar una plantilla o molde ya informado para generar los modelos. Mediante el método de comparación por homología, el programa sugiere dos secuencias, una publicada por Mackinnon en 2007 y otra por Ma J. en 2010 informadas en Protein Data Bank (PDB) como 2r9rB¹⁶⁰ y 3lutB¹⁶¹ respectivamente.

¹⁵⁹ Grissmer S, Ghanshani S, Dethlefs B, McPherson J, Wasmuth JJ, Gutman GA, Cahalan MD, Chandy KG. The Shaw-related Potassium-Channel Gene, Kv3.1, on Human Chromosome 11, Encodes the Type I K⁺ channel in T Cells. *Journal of Biological Chemistry* 267 (1992):20971-20979.

¹⁶⁰ a) Long, S.; Campbell, E.; Mackinnon, R. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* 309 (2005) 897-903.

Con estos moldes, se encontró una identidad del 79 y 69% con 2r9rB (Figura A3.4) y de 84 y 74 % con 3lutB (Figura A3.5) para rKv1.3 (y hKv1.3) y dShIR respectivamente.

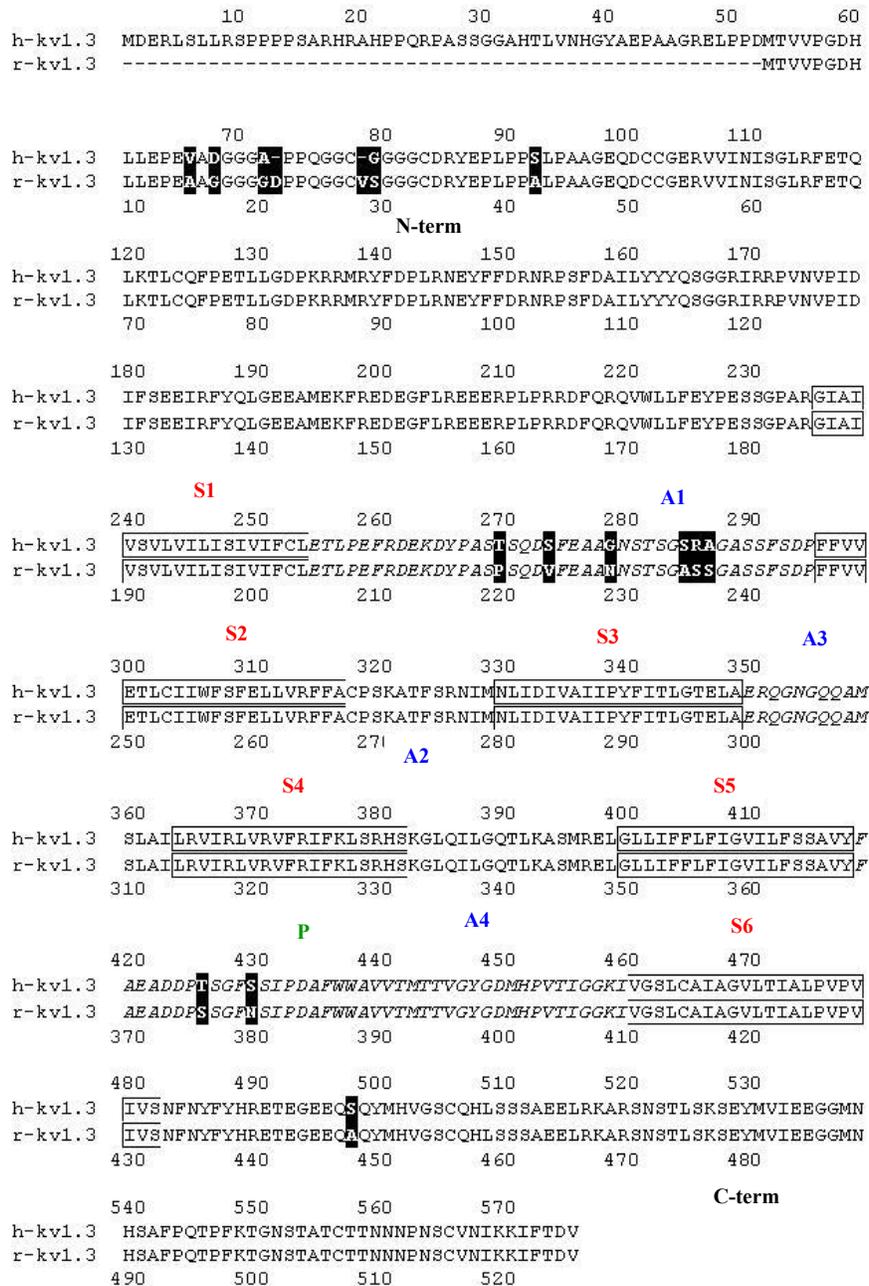


Figura A3.3. Análisis comparativo de secuencias de rKv1.3 y de hKv1.3 NP_002223.3 reportada por Grissmer.

b) Long, S.; Tao, X.; Campbell, E.; Mackinnon, R. Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* 450 (2007) 376-382.

¹⁶¹ Chen, X.; Wang, Q.; Ni, F.; Ma, J. Structure of the full-length Shaker potassium channel Kv1.2 by normal-mode-based X-ray crystallographic refinement. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107 (2010) 11352-11357.

A3.1.4

Análisis comparativo de Kv1.3 de rata y humano (NP_062143.3 y P22001 respectivamente), dShIR (NP728123.1) con 2r9r_B (Quimera de Kv1.2-Kv2.1 y subunidad B de Shaker). Se encontró identidad del 79 % para Kv1.3 y del 69 % con dShIR.

```

rKv1.3_NP_062143.3 -----MTVVPGDH
dShE_NP728123.1 -----MAAVAGLYGLGEDRQHRKKQQQQQHQKEQLEQKEEQKKAERKQLQREQQ
hKv1.3_P22001 MDERLSLLRSPPPPSARHRAHPPQRPASSGGAHTLVNHGYAEPAGRELPPDMTVVPGDH
2r9r_B -----MAHHHHHH
..

rKv1.3_NP_062143.3 LLEPEAAGGGGDPQGGCVSGGGCDRYEPLPPALPAAGEQDCCGERVVINISGLRFETQ
dShE_NP728123.1 LQRNSLDGYGSLPKLSSQDEEGGAGHGFGGGPQHFEPIPHDHDFCERVVINVSGLRFETQ
hKv1.3_P22001 LLEPEVADGGG-APPQGGCG-GGGCDRYEPLPPSLPAAGEQDCCGERVVINISGLRFETQ
2r9r_B HHHHGLVPRGSMVTATGDPVDEAAALPGHPQDITYDPEADHE--SSERVVINISGLRFETQ
. * . . . . . : * * * * * : * * * * *

rKv1.3_NP_062143.3 LKTLAQFPETLLGDPKRRMRYFDPLRNEYFFDRNRPSFDAILYYYQSGGRIRRPVNVPID
dShE_NP728123.1 LRTLNQFPDTLLGDPARRLRYFDPLRNEYFFDRSRPSFDAILYYYQSGGRLRRPVNVPLD
hKv1.3_P22001 LKTLAQFPETLLGDPKRRMRYFDPLRNEYFFDRNRPSFDAILYYYQSGGRIRRPVNVPID
2r9r_B LKTLAQFPETLLGDPKRRMRYFDPLRNEYFFDRNRPSFDAILYYYQSGGRLRRPVNVPLD
*:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *

rKv1.3_NP_062143.3 IFSEEIFRYQLGEEAMEKFRDEDEGFLREEERPLPRRDFQRQVWLLFEYPSSGPARGIAI
dShE_NP728123.1 VFSEEIFRYELGDQAINKFRDEDEGFIKEEERPLPDNEKQRKRVWLLFEYPSSQAARVVAI
hKv1.3_P22001 IFSEEIFRYQLGEEAMEKFRDEDEGFLREEERPLPRRDFQRQVWLLFEYPSSGPARGIAI
2r9r_B IFSEEIFRYELGEEAMEMFRDEDEGYIKEEERPLPENEFQRQVWLLFEYPSSGPARIIAI
:*:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *

rKv1.3_NP_062143.3 VSVLVILISIVIFCLETLPFRDEKDYSPASPSQDVFEAANNSTSGASSGASSFSDFPFVV
dShE_NP728123.1 ISVFVILLSIVIFCLETLPFKHYK-----VFNTTNGTKIEEDEVPDITDDFFLI
hKv1.3_P22001 VSVLVILISIVIFCLETLPFRDEKDYSPASTSQDSFEAAGNSTSGSRAGASSFSDFPFVV
2r9r_B VSMVILISIVSFCLETLPFRDENED-MHGGGVTFHTYSQSTIG-YQSTSTFDDFPFV
:*:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:* *

rKv1.3_NP_062143.3 ETLCIIWFSFELLVRFACPSKATFSRNIMNLIDIVAIIPYFITLGTELAERQNG----
dShE_NP728123.1 ETLCIIWTFELTVRFLACPNKLNFCRDVMNVIDLIAIIPYFITLATVVAEEDTLNLPK
hKv1.3_P22001 ETLCIIWFSFELLVRFACPSKATFSRNIMNLIDIVAIIPYFITLGTELAERQNG----
2r9r_B ETLCIIWFSFELLVRFACPSKAGFFTNIMNIIDIVAIIPYVITFLTESNKS-VL----
*:*:* *:* *:* *:* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

rKv1.3_NP_062143.3 -----QQAMSLAILRVIRLVRFRIFKLSRHSKGLQILGQTLKASMRELGLLIFF
dShE_NP728123.1 APVSPQDKSNQAMSLAILRVIRLVRFRIFKLSRHSKGLQILGRTLKASMRELGLLIFF
hKv1.3_P22001 -----QQAMSLAILRVIRLVRFRIFKLSRHSKGLQILGQTLKASMRELGLLIFF
2r9r_B -----QFQNVRRVQIFRIMRILRIFKLSRHSKGLQILGQTLKASMRELGLLIFF
: : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

rKv1.3_NP_062143.3 LFIGVILFSSAVYFAEADDPSSGFNSIPDAFWWAVVTMTTVGYGDMHPVTIGGKIVGSLC
dShE_NP728123.1 LFIGVILFSSAVYFAEAGSENSFFKSIPDAFWWAVVTMTTVGYGDMTPVGVWGKIVGSLC
hKv1.3_P22001 LFIGVILFSSAVYFAEADDPSTSGFSSIPDAFWWAVVTMTTVGYGDMHPVTIGGKIVGSLC
2r9r_B LFIGVILFSSAVYFAEADERSQFSPIDAFWWAVVSMTTVGYGDMVPTIGGKIVGSLC
*:*:* *:* *:* *:* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

rKv1.3_NP_062143.3 AIAGVLTIALPVPVIVSNFNYFYHRETEGEEQA--QYMHVGSCQHLSSSAEELRKARSNS
dShE_NP728123.1 AIAGVLTIALPVPVIVSNFNYFYHRETDQEEMQSNFNHVTSCPYLPGTLGQHMK-KSSL
hKv1.3_P22001 AIAGVLTIALPVPVIVSNFNYFYHRETEGEEQS--QYMHVGSCQHLSSSAEELRKARSNS
2r9r_B AIAGVLTIALPVPVIVSNFNYFYHRETEGEEQA--QYLVTSSPKIPS-SPDLKKSRSAS
*:*:* *:* *:* *:* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

rKv1.3_NP_062143.3 TLSKSEYMVIEEGGMN-----
dShE_NP728123.1 SESSDMMDLDDGVESTPLGTETHPGRSAVAPFLGAQQQQQPVASSLSMSIDKQLQHPL
hKv1.3_P22001 TLSKSEYMVIEEGGMN-----
2r9r_B TISKSDYMEIQEGVNNS-----
: * . * : * : * .

```

```

rKv1.3_NP_062143.3      -----HSAFPQTPFKTGNSTATCTTNNNPNSCVNI
dShE_NF728123.1      QQLTQTQLYQQQQQQQQQNGFKQQQQQTQQQLQQQSHINASAAAATSGSGSSGLTM
hKv1.3_P22001          -----HSAFPQTPFKTGNSTATCTTNNNPNSCVNI
2r9r_B                 -----NEDFREENLKTANSTLANTN-----YVNI
                        :. : : : * * : : : . : : :

```



```

rKv1.3_NP_062143.3      KK-----IFTDV
dShE_NF728123.1      RHNNALAVSIETDV
hKv1.3_P22001          KK-----IFTDV
2r9r_B                 TK-----MLTDV
                        :           : ***

```



```

* - residuos conservados
: - conservación de grupos fuertes
. - conservación de grupos débiles
- grupos no conservados

```

Figura A3.4. Análisis comparativo de secuencias de rKv1.3, hKv1.3, dShIR con el molde 2r9rB.


```

hKv1.3_P22001          -----HSAFPQTPFKGTGNSTATCTTNNNPNSCV
rKv1.3_NP_062143.3    -----HSAFPQTPFKGTGNSTATCTTNNNPNSCV
3lut_B                 -----NEDFRENLKTAN----CTLAN--TNYV
dShE_NP728123.1       PLOQLTQTQLYQQQQQQQQQNGFKQQQQQTQQQLQQQQSHTINASAAAATSGSGSSGL
                               :. : : : * * .: . . :
                               :. : : : * * .: . . :

hKv1.3_P22001          NIKK-----IFTDV
rKv1.3_NP_062143.3    NIKK-----IFTDV
3lut_B                 NITK-----MLTDV
dShE_NP728123.1       TMRHNNALAVSIETDV
                               .: : : : * *

```

* - residuos conservados
: - conservación de grupos fuertes
. - conservación de grupos débiles
- grupos no conservados

Figura A3.5. Análisis comparativo de secuencias de rKv1.3, hKv1.3, dShIR con el molde 3lutB

A3.2. Estudios de acoplamiento en tetrámeros.

Para el verificar los sitios de interacción en los tetrámeros de rKv1.3, en el docking se utilizó un GRID de 126 x 126 x 126 Å y un espaciamiento de 0.769 Å intentando abarcar la parte superior del tetrámero aunque se perdiera resolución. En la figura A3.6 se muestran los sitios de acoplamiento de la NQ solo sobre una subunidad α aunque éstos se repiten de igual forma en el homotetrámero. Los sitios donde ocurren los acoplamientos son similares a los encontrados con el monómero. Los resultados también sugieren que la interacción con NQ se favorece por la parte extracelular de la proteína. Hay que resaltar que se confirma una marcada interacción de la NQ en el A3 donde se encuentra la metionina de interés. A su vez, se corrobora que el conformero más estable se genera en la cavidad de A3. En las figuras A3.7 y A3.8 se muestra la interacción de NQ con la metionina 308 encontrada en los tetrámeros de rKv1.3 modelados con 2r9rB y 3lutB respectivamente. Cabe mencionar que debido al tamaño del tetrámero, no fue posible abarcarlo completamente con una resolución apropiada y es por ello que los análisis más detallados que se muestran en el capítulo 6 de este trabajo se realizan con los monómeros.



Figura A3.6. Acoplamientos de NQ con el tetrámero de rKv1.3_2r9rB encontrados mediante docking. Para el agrupamiento de las interacciones se considera una desviación estándar de 0.5Å. Los conformeros se representan en forma de líneas sobre el sitio de interacción.

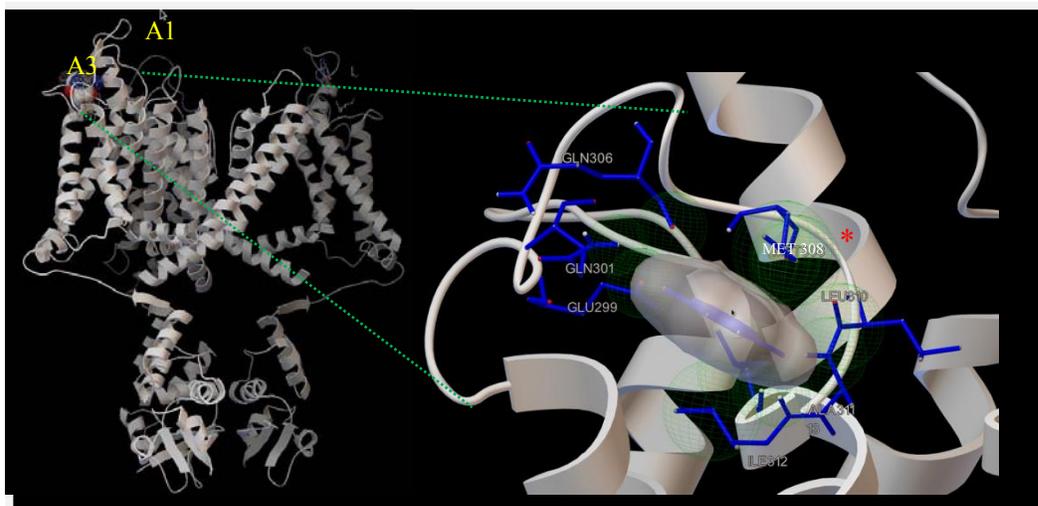


Figura A3.7 Acoplamiento de NQ en A3 de rKv1.3_2r9rB y representación del conformero más estable formado con Met308.

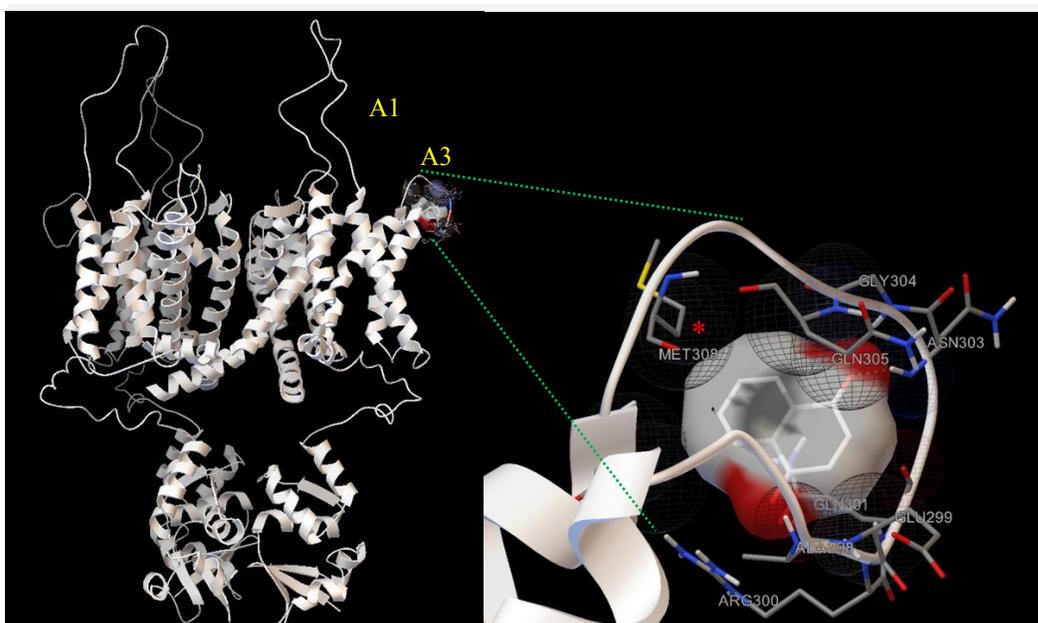


Figura A3.8 Acoplamiento de NQ en A3 de rKv1.3_3lutB y representación del conformero más estable formado con Met308.

A3.3. Predicción de sitios de interacción de NQ en Kv1.3.

El análisis detallado de los resultados de docking con rKv1.3_3lutB (tabla A3.2) demostraron que el acoplamiento NQ-canal más estable (ΔG -5.95) ocurre en la cavidad formada en A3, (tabla A3.1). El porcentaje de conformeros NQ-rKv1.3_3lutB-A3-M308, es del 54% (tabla A3.2, primera fila). Se demostró la formación de puentes de hidrógeno con aa no polares (Ala298, Leu310 e Ile312) polares (Asn303) y cargados (Arg300). Así mismo, existen interacciones cercanas con Ser309 y con aa ácidos (Glu296 y Glu299). Por otra parte en A1 (tabla A3.2, segunda fila), se observaron 19 interacciones con ΔG -4.72 del tipo hidrofóbicas con aromáticos (Phe209 y Phe241), puentes de hidrógeno con Arg210 e interacciones cercanas con aa hidroxilados (Ser240 y Ser242) y ácidos (Glu204 y Glu208). Finalmente, se encontraron 3 interacciones principalmente hidrofóbicas con Phe246 y Tyr289 localizadas entre A1 y A3 (tabla A3.2, tercera fila), sin embargo, estas son menos estables que las anteriores (ΔG -4.47).

A modo de comparación, se realizó el mismo análisis para hKv1.3_2r9rB encontrando que el acoplamiento más estable (ΔG -5.27) es NQ-hKv1.3_2r9rB-A3-M358. El 45% de los conformeros se generan dentro de la cavidad compuesta por los residuos expresados en la tabla A3.1 en cuyo interior, hay la formación de puentes de hidrógeno con aa similares a NQ-rKV1.3_2r9rB (véase tabla 6.2 y A3.3 primera fila). Así mismo, se observan interacciones cercanas con Glu349 y Gln351. En la segunda fila de la tabla A3.3 se muestra que 19 acoplamientos menos estables ΔG -4.47, se forman en A1 donde sobresalen las interacciones hidrofóbicas (Phe259, Phe274 y Phe295). También se encontraron interacciones cercanas con aa hidroxilados (Ser280, Ser282, Ser284 y Thr342) y ácidos (Glu254, Glu262, Glu275, Glu349). Por otra parte, se encontraron 13 acoplamientos (ΔG -4.29) en el espacio entre A1 y A3 cerca de Met358. Aquí, también hay formación de puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas con Phe274 e interacciones cercanas con Thr342, Thr345 y Ser359 (tabla A3.3, tercera fila). Finalmente, se encontraron 5 acoplamientos (no se muestran) menos estables que se dan en la parte superior entre S2, S3 y S4.

El análisis con hKv1.3_3lutB, demostró que el acoplamiento más estable $\Delta G -5.88$ es NQ-hKv1.3_3lutB-A3-M358 con 51% de probabilidad de formación (tabla A3.4, primera fila). Como ya se había observado, estos acoplamientos, se llevan a cabo dentro de la misma cavidad en A3 detallada para hKv1.3_2r9rB en la tabla A3.1, en cuyo interior hay formación de puentes de hidrógeno e interacciones cercanas con aa semejantes a hKv1.3_2r9rB (tabla A3.3 y A3.4 primera fila). Por otra parte, en A1 (tabla A3.4, segunda fila) se observaron 30 acoplamientos $\Delta G -4.71$, donde hay formación de puentes de hidrógeno con aa cargados (Arg260 y Lys263) interacciones hidrofóbicas con Phe259 y Phe29, así como interacciones cercanas con aa hidroxilados (Ser290 y Ser292) y ácidos (Glu254, Glu258, Asp261 y Glu262). Finalmente, para hKv1.3_3lutB, se demostraron 3 interacciones principalmente hidrofóbicas con Phe295, Phe296 y Tyr339 localizadas en la parte superior de S2 y S3 (tabla A3.4, tercera fila) sin embargo, estas son menos estables que las anteriores ($\Delta G -4.46$).

Canal_molde	Aminoácidos que forman la cavidad de interés
rKv1.3_2r9rB y 3lutB	Ala298, Glu299, Arg300, Gln301, Gly302, Asn303, Gly304, Gln305, Gln306, Ala307, Met308, Ser309, Leu310, Ala311, Ile312 y Leu313
hKv1.3_2r9rB y 3lutB	Ala348, Glu349, Arg350, Gln351, Gly352, Asn353, Glu354, Gln355, Gln356, Ala357, Met358, Ser359, Leu360, Ala361, Ile362 y Leu363

Tabla A3.1 Aminoácidos que forman la cavidad en A3 donde se observa la interacción con la Met

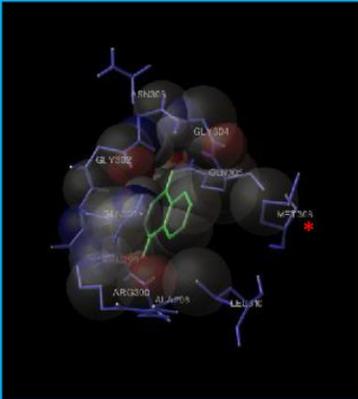
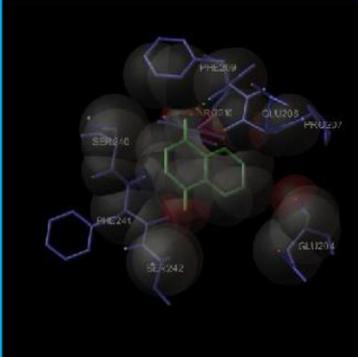
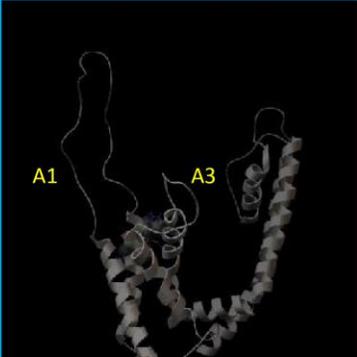
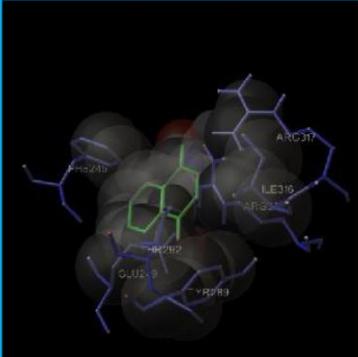
Sitio de acoplamiento NQ-rKv1.3_3lutB	Interacciones finas de acoplamiento NQ-rKv1.3	ΔG	p	Interacciones
		-5.95	54	*Met308 Puentes H: Ala298, Arg300, Asn303, Leu310, Ile312, Cerca: Thr292, Glu296, Glu299, Asn303, Ser309
		-4.72	19	Puentes H: Arg210 Hidrofóbicas: Pro207, Phe209, Phe241 Cerca: Glu204, Glu208 Ser240, Ser242
		-4.47	3	Hidrofóbicas: Phe246, Tyr289 Cerca: Glu249

Tabla A3.2 Agrupamiento de conformeros NQ-rKv1.3_3lutB que interactúan por la parte extracelular de la proteína. Primera columna: Monómero de Kv1.3 donde se muestra el Sitio de acoplamiento NQ-rKv1.3 cerca de A1 y A3 extracelular. Segunda columna: interacciones finas con aa implicados en el acoplamiento NQ-rKv1.3. La molécula de NQ se denota en forma de barras y las esferas representan los radios de Van Der Waals de cada uno de los átomos involucrados en el acoplamiento. Tercera columna: ΔG de acoplamiento obtenido directamente de resultados de docking. Cuarta columna: Probabilidad, p, es el # de conformeros que se llegan a formar en ese sitio de acoplamiento. Quinta fila: Tipo de interacciones que se observan en la formación de conformero de interés. Puentes H, se refiere a puentes de hidrógeno que arroja el programa. Cerca, se refiere a interacciones cercanas de algunos aa con NQ. Hidrofóbicas, se refieren a interacciones tipo pi con aa aromáticos.

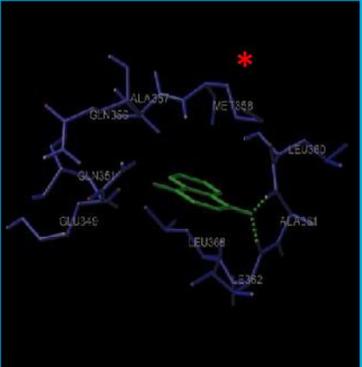
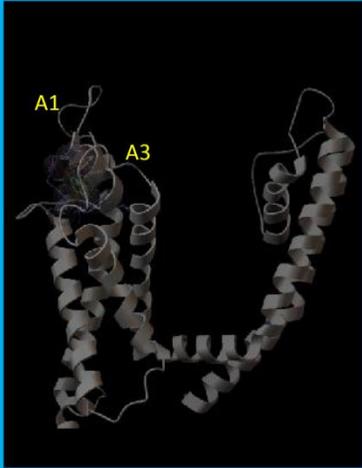
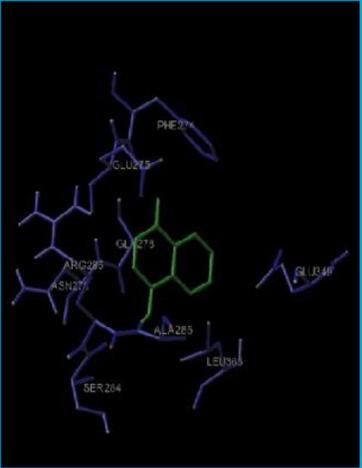
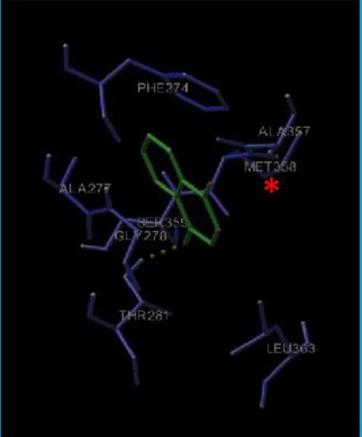
Sitio de acoplamiento NQ-hKv1.3_2r9rB	Interacciones finas de acoplamiento NQ-hKv1.3	ΔG	p	Interacciones
		-5.27	45	*Met358 Puentes H: Leu360, Ala361, Ile362, Leu363 Cerca : Glu349,Gln351, Gln356
		-4.47	19	Puentes de H: Ala286, Arg367 Hidrofóbicas: Phe259, Phe274, Phe295, Cerca: Glu254, Arg260 Glu262, Glu275, Asn279, Ser280, Ser282, Ser284, Arg285, Thr342, Glu349, Arg367
		-4.29	13	*Met358 Puentes de H: Thr281, Ala348, Glu349 Hidrofóbicas: Phe274 Cerca: Thr342, Thr345, Glu346, Glu349, Ser359

Tabla A3.3 Agrupamiento de conformeros NQ-hKv1.3_2r9rB que interactúan por la parte extracelular de la proteína. Primera columna: Monómero de hKv1.3 donde se muestra el Sitio de acoplamiento NQ-hKv1.3 cerca de A1 y A3 extracelular. Segunda columna: interacciones finas con aa implicados en el acoplamiento NQ-hKv1.3. La molécula de NQ se denota en forma de barras y las esferas representan los radios de Van Der Waals de cada uno de los átomos involucrados en el acoplamiento. Tercera columna: ΔG de acoplamiento obtenido directamente de resultados de docking. Cuarta columna: Probabilidad, p, es el # de conformeros que se llegan a formar en ese sitio de acoplamiento. Quinta fila: Tipo de interacciones que se observan en la formación de conformero de interés. Puentes H, se refiere a puentes de hidrógeno que arroja el programa. Cerca, se refiere a interacciones cercanas de algunos aa con NQ. Hidrofóbicas, se refieren a interacciones tipo pi con aa aromáticos.

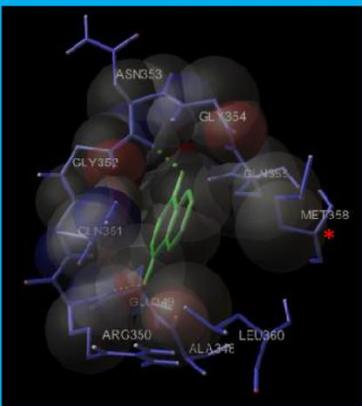
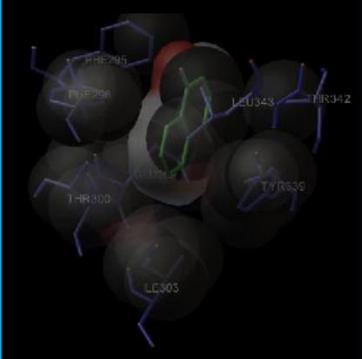
Sitio de acoplamiento NQ-hKv1.3_3lutB	Interacciones finas de acoplamiento NQ-hKv1.3	ΔG	p	Interacciones
		-5.88	51	Met358* Puentes H: Arg350, Asn353, Gly354, Ala361 Cerca: Thr342, Glu346, Glu349, Asn353, Ser359, Leu360
		-4.71	30	Puentes H: Arg260, Glu262, Lys263 Hidrofóbicas: Pro257, Phe259, Phe291 Cerca: Glu254, Glu258, Asp261, Glu262, Ser290, Ser292
		-4.46	3	Hidrofóbicas: Phe295, Phe296, Tyr339 Cerca: Glu299, Arg370, Arg367

Tabla A3.4 Agrupamiento de conformeros NQ-hKv1.3_3lutB que interactúan por la parte extracelular de la proteína. Primera columna: Monómero de hKv1.3 donde se muestra el Sitio de acoplamiento NQ-hKv1.3 cerca de A1 y A3 extracelular. Segunda columna: interacciones finas con aa implicados en el acoplamiento NQ-hKv1.3. La molécula de NQ se denota en forma de barras y las esferas representan los radios de Van Der Waals de cada uno de los átomos involucrados en el acoplamiento. Tercera columna: ΔG de acoplamiento obtenido directamente de resultados de docking. Cuarta columna: Probabilidad, p, es el # de conformeros que se llegan a formar en ese sitio de acoplamiento. Quinta fila: Tipo de interacciones que se observan en la formación de conformero de interés. Puentes H, se refiere a puentes de hidrógeno que arroja el programa. Cerca, se refiere a interacciones cercanas de algunos aa con NQ. Hidrofóbicas, se refieren a interacciones tipo pi con aa aromáticos.

A3.4. Predicción de sitios de interacción de NQs en Kv1.3.

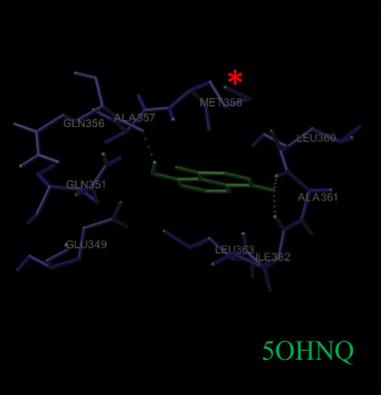
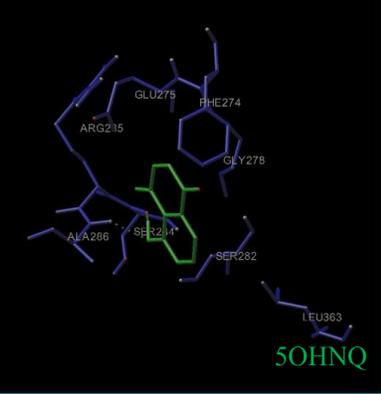
Acoplamiento de 5OHNQ_Kv1.3	Interacciones finas de acoplamiento 5OHNQ-Kv1.3	ΔG	p	Interacciones
		-5.31	29	*Met358 Puentes H: Gln351, Gln356 Ala361, Ile362, Leu363 72 (2.5) Cerca : Glu349, Gln351, Gln356
		-4.89	41	Puentes H: Ser284, Ala286, Gly287, Ala348 68 (1.66) Cerca : Ser282, Arg285, Glu275, Thr342, Glu346

Tabla A3.5 Agrupamiento de conformeros 5OHNQ_Kv1.3 que interactúan por la parte extracelular de la proteína. Primera columna: Monómero de Kv1.3 donde se muestra el Sitio de acoplamiento 5OHNQ-Kv1.3 cerca de A1 y A3 extracelular. Segunda columna: interacciones finas con aa implicados en el acoplamiento 5OHNQ-Kv1.3. Las moléculas de 5OHNQ se denotan en forma de barras. Tercera columna: ΔG de acoplamiento obtenido directamente de resultados de docking. Cuarta columna: Probabilidad, p, es el # de conformeros que se llegan a formar en ese sitio de acoplamiento. Quinta fila: Tipo de interacciones que se observan en la formación de conformero de interés. Puentes H, se refiere a puentes de hidrógeno que arroja el programa. Cerca, se refiere a interacciones cercanas de algunos aa con NQ. 5OHNQ, 5-hidroxi-1,4-naftoquinona; NQ, 1,4-naftoquinona; 2NH₂NQ, 2-amino-1,4-naftoquinona. Hidrofóbicas, se refieren a interacciones tipo pi con aa aromáticos.

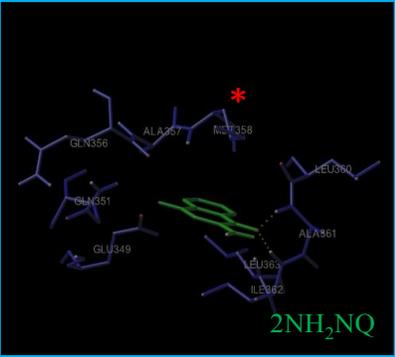
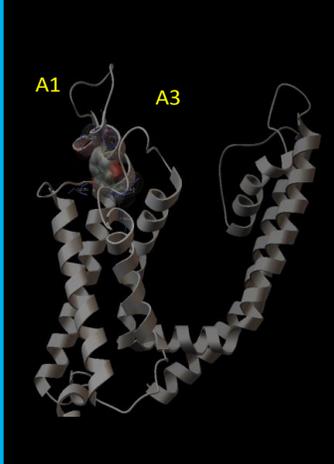
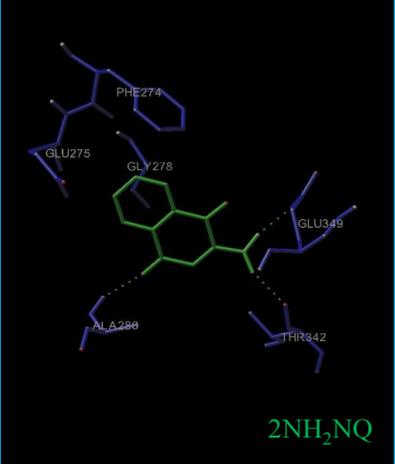
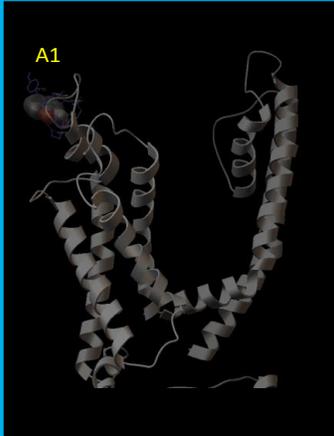
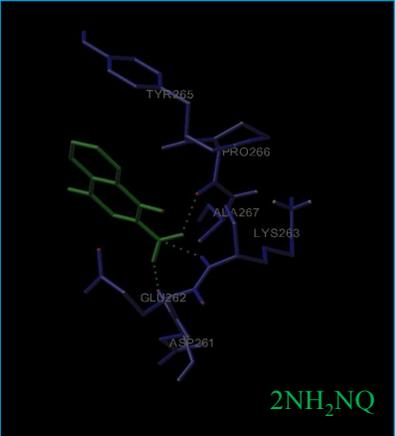
Acoplamiento de 2NH ₂ NQ_Kv1.3	Interacciones finas de acoplamiento 2NH ₂ NQ-Kv1.3	ΔG	p	Interacciones
		-5.46	30	*Met358 Puentes H: Glu349, Met358 Ala361, Ile362, 52 (1.7) Cerca : Glu349, Gln351, Gln356
		-4.99	45	Puentes H: Glu275, Ala286, Gly287, Thr342 Leu343, Ala348 Glu349 97 (2.16) Hidrofóbicas: Phe274 Cerca: Asn279, Ser282, Ser284, Arg285, Ser289, Glu346, Glu349
		-4.13	8	Puentes H: Glu262, Lys263, Pro266, Arg285, 8 (1.6) Hidrofóbicas: Phe259, Tyr265, Pro294, Phe295 Cerca: Glu254 Arg260, Asp261, Ser268, Asn279, Ser280, Ser292, Asp293

Tabla A3.6 Agrupamiento de conformeros 2NH₂NQ-Kv1.3 que interactúan por la parte extracelular de la proteína. Primera columna: Monómero de Kv1.3 donde se muestra el Sitio de acoplamiento 2NH₂NQ-Kv1.3 cerca de A1 y A3 extracelular. Segunda columna: interacciones finas con aa implicados en el acoplamiento 2NH₂NQ-Kv1.3. Las moléculas de 2NH₂NQ se denotan en forma de barras. Tercera columna: ΔG de acoplamiento obtenido directamente de resultados de docking. Cuarta columna: Probabilidad, p, es el # de conformeros que se llegan a formar en ese sitio de acoplamiento. Quinta fila: Tipo de interacciones que se observan en la formación de conformero de interés. Puentes H, se refiere a puentes de hidrógeno que arroja el programa. Cerca, se refiere a interacciones cercanas de algunos aa con NQ. 5OHNQ, 5-hidroxi-1,4-naftoquinona; NQ, 1,4-naftoquinona; 2NH₂NQ, 2-amino-1,4-naftoquinona. Hidrofóbicas, se refieren a interacciones tipo pi con aa aromáticos.

A3.5. Predicción de sitios de interacción de NQs en ShIR.

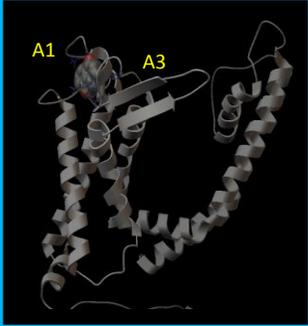
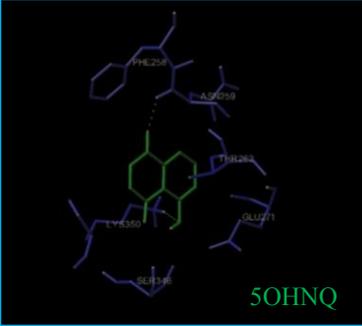
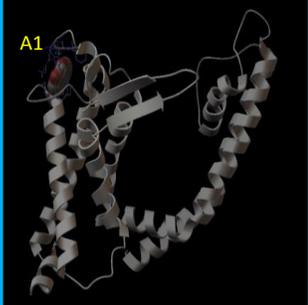
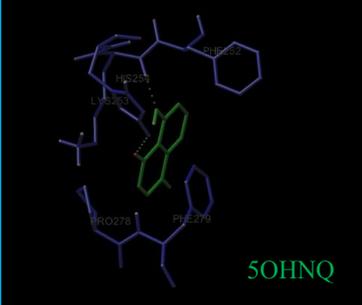
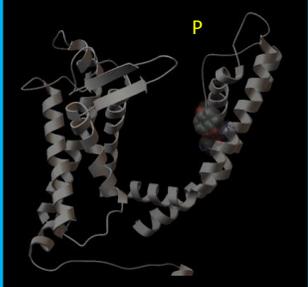
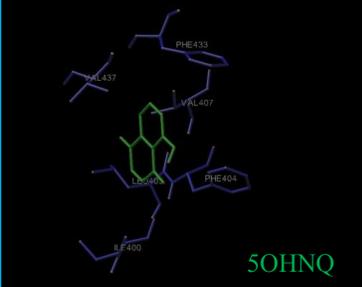
Acoplamiento de 5OHNQ_ShIR	Interacciones finas de acoplamiento 5OHNQ-ShIR	ΔG	p	Interacciones
		-4.33	29	Puentes H: Asn259, Ser346, Lys350 29 (1.4) Hidrofóbicas: Phe258, Pro273, Pro347 Cerca: Thr262, Glu271, ASp349, Ser351
		-4.15	15	Puentes H: Lys253, His254 14 (0.9) Hidrofóbicas: Pro278, Phe279 Cerca: Glu251, Glu269
		-3.23	2	Puentes de H: Glu333, Leu355 3 (1.5)
		-3.36	17	Hidrofóbicas: Phe404, Phe433, Trp4.34

Tabla A3.7. Agrupamiento de conformeros 5OHNQ-dShIR que interactúan por la parte extracelular de la proteína. Primera columna: Monómero de dShIR donde se muestra el Sitio de acoplamiento 5OHNQ-ShIR cerca de A1 y A3 extracelular. Segunda columna: interacciones finas con aa implicados en el acoplamiento 5OHNQ-dShIR. Las moléculas de 5OHNQ se denotan en forma de barras. Tercera columna: ΔG de acoplamiento obtenido directamente de resultados de docking. Cuarta columna: Probabilidad, p, es el # de conformeros que se llegan a formar en ese sitio de acoplamiento. Quinta fila: Tipo de interacciones que se observan en la formación de conformero de interés. Puentes H, se refiere a puentes de hidrógeno que arroja el programa. Cerca, se refiere a interacciones cercanas de algunos aa con NQ. 5OHNQ, 5-hidroxi-1,4-naftoquinona; NQ, 1,4-naftoquinona; 2NH₂NQ, 2-amino-1,4-naftoquinona. Hidrofóbicas, se refieren a interacciones tipo pi con aa aromáticos.

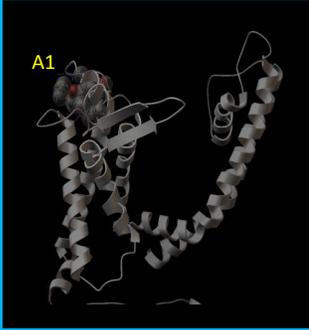
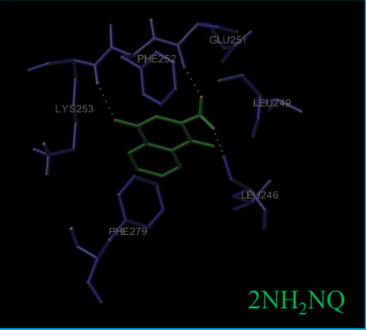
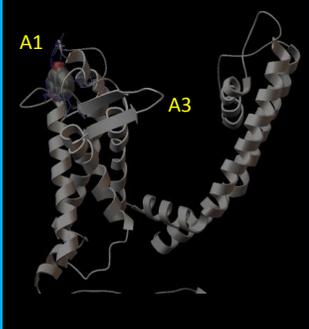
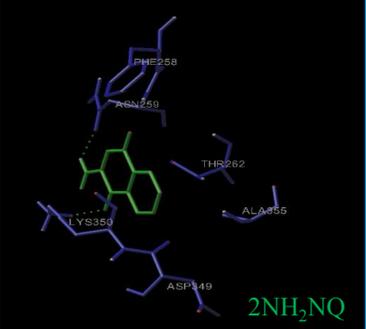
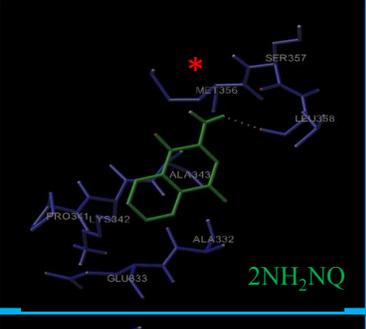
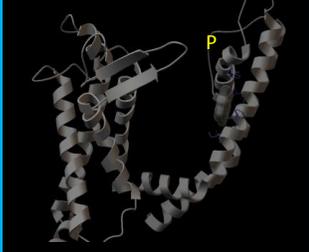
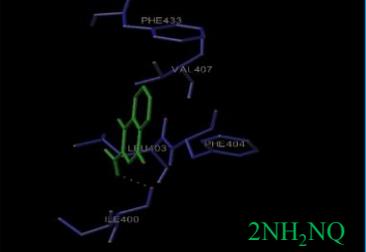
Acoplamiento de 2NH ₂ NQ_dShIR	Interacciones finas de acoplamiento 2NH ₂ NQ-ShIR	ΔG	p	Interacciones
		-4.73	18	Puentes H: Leu246, Glu251, Lys253, Asn263, Arg365 26 (1.4) Hidrofóbicas: Phe252, His254, Phe279, Pro278 Cerca: Glu247
		-4.36	27	Puentes H: Asn259, Asp270, Glu271, Lys350, Ser346, Asp349 53 (1.96) Hidrofóbicas: Phe258, Pro273, Phe280, Pro347 Cerca: Thr262, Ser351, Ser352
		-3.80	8	Puentes H: Val331, Glu333, Lys342, Leu358 11 (1.4) Hidrofóbicas: Pro341 Cerca: Thr329, GLU334, Ser357
		-3.81	10	Puentes H: Ile400, Asp431, Trp343, Tyr445 7 (0.7) Hidrofóbicas: Phe404, Pro430, Phe433, Trp434

Tabla A3.8 Agrupamiento de conformeros 2NH₂NQ-dShIR que interactúan por la parte extracelular de la proteína. Primera columna: Monómero de dShIR donde se muestra el Sitio de acoplamiento 2NH₂NQ-dShIR cerca de A1 y A3 extracelular. Segunda columna: interacciones finas con aa implicados en el acoplamiento 2NH₂NQ-dShIR. Las moléculas de 2NH₂NQ se denotan en forma de barras de color verde. Tercera columna: ΔG de acoplamiento obtenido directamente de resultados de docking. Cuarta columna: Probabilidad, p, es el # de conformeros que se llegan a formar en ese sitio de acoplamiento. Quinta fila: Tipo de interacciones que se observan en la formación de conformero de interés. Puentes H, se refiere a puentes de hidrógeno que arroja el programa. Cerca, se refiere a interacciones cercanas de algunos aa con NQ. 5OHNQ, 5-hidroxi-1,4-naftoquinona; NQ, 1,4-naftoquinona; 2NH₂NQ, 2-amino-1,4-naftoquinona. Hidrofóbicas, se refieren a interacciones tipo pi con aa aromáticos.



Electrochemical strategy to scout 1,4-naphthoquinones effect on voltage gated potassium channels

T. Rodríguez-Fernández ^a, V.M. Ugalde-Saldívar ^b, I. González ^c, L.I. Escobar ^d, J. García-Valdés ^{a,*}

^a Facultad de Química, Departamento de Química Analítica, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., CP 04510, México

^b Facultad de Química, Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., CP 04510, México

^c Departamento de Química, Área de Electroquímica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México D.F., CP. 09340, México

^d Facultad de Medicina, Departamento de Fisiología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., CP 04510, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 July 2011

Received in revised form 4 December 2011

Accepted 21 December 2011

Available online 30 December 2011

Keywords:

Naphthoquinones

Ion channel

Voltage-gated potassium channel

Redox potential

Cyclic voltammetry

ABSTRACT

Naphthoquinone (NQ) was tested on voltage-gated ion channels expressed in *Xenopus laevis* oocytes. The activity of potassium Shaker channel with Inactivation domain Removed (ShIR) was not affected; in contrast, NQ diminished Kv1.3 currents. A current decrease was barely observed with the oxidant H₂O₂. These findings suggested that redox properties were involved in the naphthoquinone–Kv1.3 channel interaction. NQ and some derivatives (NQs) were characterized in DMSO and physiological (ND-96) media by cyclic voltammetry. A typical two-stage mono-electronic reduction mechanism was observed in DMSO, while a one-stage bi-electronic reduction process was found in ND-96 medium. NQs with the lowest and the highest redox potential values were tested on both channels. Voltage-clamp recordings showed that inhibition of Kv1.3 was dependent on NQs redox potential. Results demonstrated that structural features (aromaticity and substituents prone to hydrogen bonds formation) of NQs were also important. This effect could be explained by interactions of some channel residues with NQs that contribute to favor their reduction process in the protein surroundings. The electrochemical strategy presented to simulate the cellular environments (aqueous and non-aqueous) that NQs may face, is an important contribution to pre-select (in a fine and simple way) the best redox compounds for electrophysiological testing.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Ion channels span through the cellular membrane forming aqueous pores that open or close in response to specific stimuli such as change in membrane voltage, binding of ligands or mechanical stress. These stimuli produce conformational changes commonly referred as gating. Ion channels allow the selective permeation of Na⁺, K⁺, Ca²⁺ or Cl[−] ions across the membrane down their electrochemical gradient [1]. During an action potential, the voltage-gated potassium channels, or Kv family, open rapidly promoting membrane repolarization by the exit of potassium ions. The α -subunit of these channels has six transmembrane segments (S1 to S6, with S4 as the voltage sensor) and a pore domain (P). The S segments are linked by two intra and

two extracellular loops (for amino acid sequence details, see Fig. 8). Four α subunits assemble to a functional tetramer in which symmetry axis is the aqueous pore. The Kv1.x subfamily, expressed commonly in excitable cells, participates in neuronal excitability and muscular contraction. Shaker and homologous (Kv1.1, and Kv1.3) are the most studied channels whose pharmacology, gating and conductance properties are covered by many reports [1–4]. Shaker channel plays an important role in the excitability of muscle and photoreceptor cells in *Drosophila*. Interestingly, the Kv1.3 is a key protein in non-excitabile cells: it is a secretory K⁺ channel in the kidney [5] and it is present in T lymphocytes [6]. Kv1.3 has been associated with autoimmune diseases [7,8]. Therefore, many authors are concerned in finding compounds that modify Kv1.3 activity such as peptides [9–11] or drugs [12–14]. However, less is known about Kv1.3 modulation by compounds with redox properties [15,16].

Quinones (Qs) are compounds vastly studied due to their ubiquity in living systems. They are related to important biological functions as: the electron transfer chain in mitochondria [17], antineoplastics, anticancerogenics [18], antiprotozoan [19], bactericides [20], fungicides [21] and they also are vitamins [22] and cofactors. The Qs promote oxidative stress [23–25] and, in some cases, react with methionine and cysteine residues in proteins [26,27]. The activity of some proteins, including membrane proteins such as ion channels, is modified strikingly [27–31].

Abbreviations: NQ, 1,4-naphthoquinone; NQs, 1,4-naphthoquinone derivatives; 2NH₂NQ, 2-amine-1,4-naphthoquinone; 2MeONQ, 2-methoxy-3-methyl-1,4-naphthoquinone; 5OHNQ, 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone; 2SO₃KNQ, 1,4-naphthoquinone-2-sulphonic acid potassium salt; Kv, voltage-gated potassium channel; ShIR, Shaker channel with Inactivation domain Removed.

* Corresponding author at: Facultad de Química, Departamento de Química Analítica, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, México. Tel.: +52 55 56223499; fax: +52 55 56223723.

E-mail address: jesusgv65@hotmail.com (J. García-Valdés).

It has been shown that Quinone (Q) redox activity is related to the ability to accept electrons (redox potential): to yield the radical anion ($Q^{\cdot-}$) or dianion (Q^{2-}) respectively. Redox potential is closely related to the chemical and electronic environments provided by the solvent and the chemical substituents (electroattractor or electrodonor nature) in the structure [32–37]. In summary, electrochemical and redox properties of Qs are important factors that modify their biologic activity [38,39]. Up to date most of the electrochemical assays with Qs have been performed in aprotic media as dimethylsulfoxide, acetonitrile or dimethylformamide, due to inexistent collateral reactions with these solvents. However, in water, the solvent participates in proton–donor interactions. Although NQs are slightly soluble in water; a tiny amount is enough to produce the cathodic current in cyclic voltammetry (CV). Interestingly, aprotic media could mimic, to some extent, the electronic transference that takes place in biological membranes. Electrochemical studies in protic medium can be used to simulate some quinone redox reactions that may occur intra or extracellularly [17,40,41]. Hydrogen bond formation (intra or inter molecular) in Qs is favored in aqueous media and they modify the energetic requirements for Qs reduction and, consequently, their redox potential [32]. Similar findings are shown by proton donor species in aprotic media assays [33–37].

In summary, the electronic effects provided by chemical substituent and the interactions with solvent, are important to set the Qs redox potential. Therefore, the oxidant nature of Qs could be considered as modulator of the ion channel activity through fine redox interaction with the protein structure. To test this hypothesis, 1,4-naphthoquinone was used to study the redox modulation of the voltage gated potassium channels Kv1.3 and ShIR. Hydrogen peroxide and other redox species were assayed. The redox potential of NQs with different chemical substituents (as tuners of channel modulation) was evaluated in aprotic and protic media. It was found that decrease of Kv1.3 activity depended on the NQs redox potential.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and solutions

All reagents were analytical grade from Sigma-Aldrich, USA unless otherwise stated, and they were used without further purification. The employed substances were naphthoquinone derivatives (NQs), hydrogen peroxide (H_2O_2 , Aldrich, USA), reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), 2-mercaptoethanol, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), sodium dithionite ($Na_2S_2O_4$), dimethylsulfoxide (DMSO, HPLC grade, Aldrich, United Kingdom) and tetrabutylammonium hexafluorophosphate (Bu_4NPF_6 , electrochemical grade, Fluka, Switzerland). For electrochemical experiments in non-aqueous medium 0.1 M Bu_4NPF_6 /DMSO was used as supporting electrolyte. NQ derivatives solutions were prepared by dissolving 1 mg in 1 mL of supporting electrolyte. Final concentrations were 6.3, 5.8, 5.0, 5.7 or 3.6 mM for 1,4-naphthoquinone (NQ) (Fluka, China), 2-amine-1,4-naphthoquinone ($2NH_2NQ$), 2-methoxy-3-methyl-1,4-naphthoquinone (2MeONQ), 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone (5OHNQ) or 1,4-naphthoquinone-2-sulphonic acid potassium salt ($2SO_3KNQ$) respectively. For electrochemical experiments in aqueous medium, stock solutions for NQ, $2NH_2NQ$ and 5OHNQ were prepared dissolving 5.0, 2.5 and 5.0 mg, respectively, in 1 mL of ethanol (J. T. Baker, México). Variable aliquots for NQ, $2NH_2NQ$ and 5OHNQ, were added into the electrochemical cell. Final concentration, for each compound, was 100 μ M in physiological supporting electrolyte ND-96 (in mM: NaCl, 96; KCl, 2; $CaCl_2$, 1.8; $MgCl_2$, 1; and HEPES buffer, 5; pH adjusted to 7.0 with NaOH) (J. T. Baker, Mexico). All solutions were deoxygenated for at least five minutes and the electrochemical cell was kept under nitrogen atmosphere during the experiments. Either for electrochemical or electrophysiological experiments, redox agent stock solutions

were prepared in water or DMSO and added to the recording chamber to get final concentration of 100 μ M.

2.2. Functional expression of potassium channels in oocytes

Briefly, *Xenopus laevis* female frogs were anesthetized by immersion in crushed ice for 40 min and oocytes were obtained by ovariectomy. Oocyte clumps were taken apart manually with microtweezers. The follicular layer was removed by incubation during 10–20 min in 1 mg/mL of *Clostridium histolyticum* collagenase type IV (Sigma-Aldrich, Germany) in OR-2 Ca^{2+} -free medium (in mM: NaCl, 83; KCl, 2; $MgCl_2$, 1; and HEPES buffer, 5; pH 7.0 was adjusted with NaOH). Finally, cells were washed in ND-96 medium. The Kv1.3 (accession number NP_062143.3, NCBI) [42] and the ShIR (Shaker isoform E with Inactivation domain Removed; accession number NP_728123.1, NCBI) [43,44] cRNAs were transcribed in vitro using the mMessage mMachine kit (Ambion, Austin, TX) by conventional molecular biology protocols [45]. The cRNA was injected into oocytes (1–2 ng) using pulled glass capillaries and a manual microdispenser (Drummond, Broomall, PA). Oocytes were incubated for 1–2 days at 18 °C in ND-96 fortified with gentamicin 50 mg/L [46,47].

2.3. Electrophysiological recordings

Macroscopic currents were recorded using the Two Electrode Voltage clamp (TEV) technique with a CA1B amplifier (Dagan Corporation, Minneapolis, MN) and a Digidata 1200 (Axon Instruments, Sunnyvale, CA) interface. Glass capillaries modified by stretching were filled with 3 M KCl solution, and they were used to record currents. Resistance for the current or voltage electrodes were 0.3–0.5 or 1.0–1.5 M Ω , respectively. Electric contact was performed by an AgCl/Ag interface. Oocyte impalement was performed using manual micromanipulators M3301 (World Precision Instruments, Sarasota, FL). Only oocytes that elicited currents bigger than 3 μ A were used for assays. The capacity of recording chamber was 800 μ L. Data acquisition was performed with pClamp 8.0 (Axon Instruments) and data were analyzed with Origin 6.0 (MicroCal, Northampton, MA) software. For the current–voltage (I–V) curves, a pulse protocol from +60 to –60 in 20 mV decrement during 130 or 180 ms (Kv1.3 or ShIR respectively) was applied from a holding potential of –60 mV. For the currents (I_K), only the +60 mV pulse was considered. Currents were filtered at 1/5 of the sampling frequency (1 kHz), the P/4 protocol was used to reduce leak and capacitive currents. For time-course currents a pulse train was applied from –60 mV to +60 mV for 80 ms every 330 ms. The ethanol activity was assessed on ionic currents using 20, 200 and 2000 mM concentrations, being the most suitable 200 mM (data not shown). Naphthoquinones activity on potassium currents (I_{NQs}) was measured at the end of the pulse 5 min after addition. To evaluate reversibility of pharmacological effect, the chamber was perfused manually with at least 10 volumes its capacity. The inhibition percentage was determined as $\{(I_{control} - I_{NQs}) / I_{control}\} * 100$. Inhibition value was presented as mean \pm one standard deviation (\pm SD). Statistical analysis of data was carried out using the Student's *t*-test and a probability of $p < 0.05$ was considered to be statistically significant.

2.4. Electrochemical measurements

Electrochemical characterization was performed using a conventional three-electrode system in a single-compartment cell inside a C2 Faraday cage (Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN). The electrodes were: a vitreous carbon disk (7.1 mm²) as working, E_W ; a platinum wire as auxiliary, E_A ; and AgCl/Ag as reference electrode, E_R . Redox potential values were reported versus the ferricinium/ferrocene (Fc^{+}/Fc) system (0.84 V for DMSO or 0.20 V for ND-96 medium versus its respective AgCl/Ag reference) according to the IUPAC recommendation [48]. In order to facilitate the correlation with other electrochemical

data provided in literature, redox potential values referred to AgCl/Ag can be calculated by $E(\text{AgCl}/\text{Ag}) = E_{\text{measurement}} + E(\text{Fc}^+/\text{Fc})$, where $E_{\text{measurement}}$ is the reported potential in this work and $E(\text{Fc}^+/\text{Fc})$ is the value indicated above for DMSO or ND-96 medium.

Voltammetric curves were obtained using a PAR-283 potentiostat/galvanostat (EG&G Instruments, Oak Ridge, TN). Data were acquired by PowerSuite v2.56 software (EG&G Instruments) in a computer interfaced with a GPIB-USB-HS cable (National Instruments, Austin, Texas). Ohmic compensation was calculated with Origin v6.0 software employing the obtained R_u values (745Ω for DMSO and 170Ω for aqueous media) by uncompensated resistance determination. All voltammograms started from the Open Circuit Potential (OCP) and the experiments were carried out at room temperature.

3. Results and discussion

3.1. Electrophysiological recordings

In order to investigate the NQ effect on Kv1.3 and ShIR channels, TEV was used to monitor macroscopic potassium currents. *X. laevis* oocytes were employed as biological model since population of endogenous channels is small, although diverse in channel types [45–47]. So, when endogenous channels were stimulated by applying test pulses, current values were nearly zero (Fig. 1B, inset). These currents were considered as negative control. When native oocytes were injected with messenger RNA, potassium channels were overexpressed through the cell membrane. Positive currents up to 10 or $7 \mu\text{A}$ were observed when the same pulse protocol was applied (Fig. 1A and B, traces i–vi). These currents were evidently larger than those obtained with the native oocytes. The higher signals

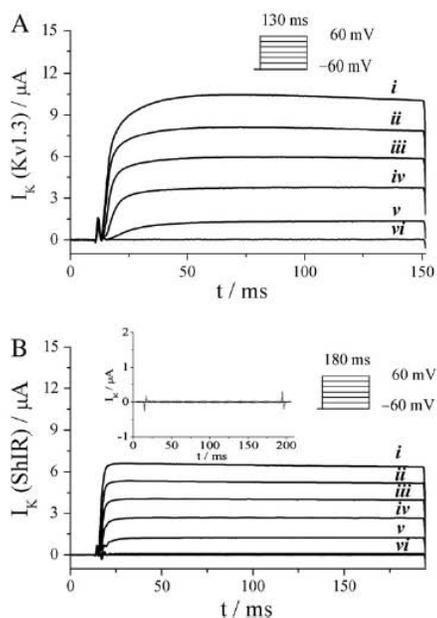


Fig. 1. Potassium outward currents for Kv1.3 (A) and ShIR (B) channels, $I_K(\text{Kv1.3})$ and $I_K(\text{ShIR})$ respectively, expressed in *X. laevis* oocytes. The current traces, for different potential pulses applied, were plotted as time function. Holding potential was -60 mV ; test pulses ranged from $+60$ to -60 mV in 20 mV decrements (with 130 or 180 ms duration): $+60$ (trace i), $+40$ (trace ii), $+20$ (trace iii), 0 (trace iv), -20 (trace v), -40 and -60 (trace vi) mV respectively. Inset shows currents for endogenous channels in native oocytes (negative control).

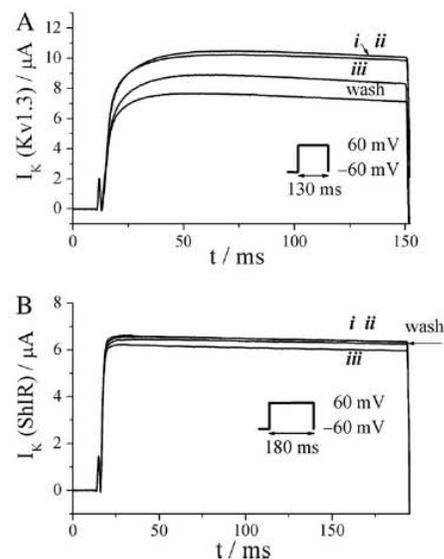


Fig. 2. Inhibition of $I_K(\text{Kv1.3})$ and $I_K(\text{ShIR})$ by $100 \mu\text{M}$ of NQ (A) and (B), respectively. Current traces elicited for (trace i) positive control; adding (trace ii) 200 mM ethanol or (trace iii) $100 \mu\text{M}$ of NQ, and finally after several washes (trace "wash"). The holding potential was -60 mV and the oocytes were stimulated by -60 to $+60 \text{ mV}$ for 130 or 180 ms of pulse duration.

were identified as potassium outward currents for Kv1.3, $I_K(\text{Kv1.3})$, (Fig. 1A) and ShIR channels current, $I_K(\text{ShIR})$, (Fig. 1B), and were used as positive control currents (I_{control}).

Positive control currents for Kv1.3 and ShIR channels, at $+60 \text{ mV}$ pulse (I_{control}), are shown in Fig. 2A, trace i and Fig. 2B, trace i respectively. NQ is sparingly soluble in aqueous medium but more soluble in ethanol. Ethanol was used to prepare NQs stock solutions and 20, 200 and 2000 mM concentrations of this solvent were assessed on ionic currents to evaluate ethanol effect (data not shown). No current modification was observed when oocytes were exposed to 200 mM ethanol for 5 min (traces ii compared with traces i in Fig. 2A and B). Addition of NQ ($100 \mu\text{M}$) clearly decreased the Kv1.3 currents, I_{NQ} (Fig. 2A, trace iii) while a small effect was observed on ShIR currents (Fig. 2B, trace iii). After exhaustive perfusion with ND-96 during 10 min, the Kv1.3 current was not recovered, while in ShIR current the small inhibitory effect was practically eliminated (traces labeled as wash in Fig. 2). According to this, NQ irreversibly inhibits the Kv1.3 current, while in ShIR the current effect was reversible. This may suggest important interactions between NQ and Kv1.3 channels. Additionally, these interactions could provoke changes to the channel structure that justify the lack of recovery of currents. Some authors proved that Qs interact with exposed thiols in channels by oxidation reaction [28,49] to yield stable products that alter their opening and/or closing. In this sense, methionyl residues could be oxidized [50] and they are also present in Kv1.3 and ShIR channels (for more details see Fig. 8). In the case that NQs are retained in biological systems, the proved effects are the angiogenesis inhibition [51] and human colon cancer cell (HCT116) growth. This could affect signal transduction pathways by disrupting protein function or could produce superoxide ($\text{O}_2^{\bullet -}$) and semiquinone radicals by a reaction with quinone reductase [52].

Trying to evaluate a possible relationship between the NQ amount and its inhibition effect on Kv1.3 channel, 1 to $300 \mu\text{M}$ concentrations were tested. Fig. 3 shows that NQ inhibited Kv1.3 channel currents in a concentration-dependent way. At higher concentrations, leak

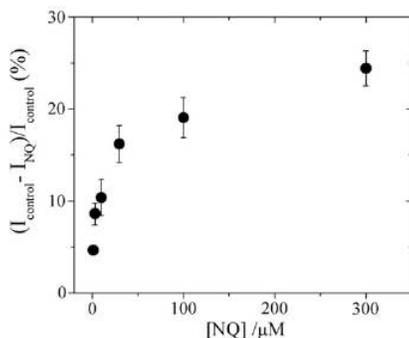


Fig. 3. The inhibition percentage for Kv1.3 current established as $((I_{\text{control}} - I_{\text{NQ}}) / I_{\text{control}}) \times 100$ and plotted versus NQ concentration. Data inhibition are mean \pm SD ($n=4$). The oocytes were stimulated with a depolarized potential from -60 at 60 mV during 200 ms from a holding potential of -60 mV.

current increased considerably ($400 \mu\text{M}$) and NQ was not totally soluble in ND-96 (at concentrations above $500 \mu\text{M}$).

Additionally, the relationship between the NQ inhibition (at $100 \mu\text{M}$ concentration) and the imposed potential (data not shown) was evaluated. The inhibition percentage values were 19.3 ± 0.9 , 17.4 ± 1.3 and 16.3 ± 2 for $+20$, $+40$ and $+60$ mV applied pulses respectively. This fact suggests a voltage-independent inhibition. Only these potential values were considered for the analysis since at this depolarized condition the channels are mostly open. The observed effect might be indicative of the fact that NQ is not directly interacting with the ion channel voltage sensor (segment 4, S4). So, NQ interaction may occur in other channel sites, such as loops, pore or transmembrane segments. Interestingly, results showed significant inhibition differences by NQ on Kv1.3 and ShIR channels even though they are members of the same family (Kv1.x).

Some authors have reported that quinones play important roles in the generation of free radicals in cells [23,24] as a consequence of their redox properties. Then, the observed inhibition of Kv1.3 channel likely occurs due to redox interaction between the NQ and the ion channel. Given the oxidant nature of Qs, it should be interesting to test the behavior of different oxidant or reducing species on Kv1.3 currents. For this reason, the oocytes were exposed to the most common biological oxidant agents, such as hydrogen peroxide (H_2O_2) and oxidized glutathione (GSSG) [31,50], and the most common reducing agents, such as reduced glutathione (GSH), 2-mercaptoethanol, sodium dithionite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) and 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB). All redox agents were evaluated at the same concentration, $100 \mu\text{M}$. The time course of the current was evaluated with 80 ms repetitive pulse potential from a holding potential of -60 mV to $+60$ mV every 2 s. Data were normalized by the current ratio $I_{\text{K(Kv1.3)}} / I_{\text{control}}$. Currents are not recovering the initial value due to ND-96 is not reversing the effect of the tested oxidants. Washing solutions do not contain any reducing agent except for those prepared specifically for that.

Fig. 4A shows a slight inhibition on Kv1.3 current in the presence of H_2O_2 , but a limited reversibility after washing the chamber (unlike that found by NQ assays). Both results are indicative of the stronger and less reversible NQ-channel interaction than that of H_2O_2 -channel. It is important to notice that after NQ addition and wash out (up arrows), the current was slowly stabilized.

GSSG produced visible hole membrane damage and increased profoundly the leak currents. Oxidant power seemed to be important to produce inhibition, but the structure could be too. In an attempt to verify if reductant process also affects currents, reducing agents were tested. Current measurements with sodium dithionite did not inhibit the Kv1.3 current (Fig. 4B). Other reductants were aggressive

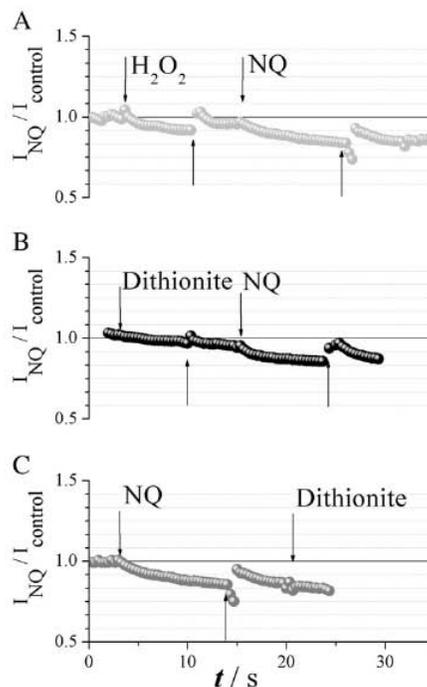


Fig. 4. Evaluation of redox compounds activity on Kv1.3 currents. Time course currents obtained after $100 \mu\text{M}$ additions of hydrogen peroxide, H_2O_2 (A) and sodium dithionite, Dithionite, (B) on Kv1.3 current, followed by NQ inhibition. Time course currents obtained after $100 \mu\text{M}$ addition of NQ followed by $100 \mu\text{M}$ Dithionite (C). Symbols represent the current measured at the end of the pulse (80 ms) of a voltage clamp at $+60$ mV. Pulses were applied every 2 s. Additions are indicated by down arrows, and washes, by up arrows.

and disrupted the membrane (data not shown). The inhibition of Kv1.3 channel seemed to be related to the oxidant nature of NQ and H_2O_2 . Trying to reverse the NQ effect, the oocytes were exposed to $100 \mu\text{M}$ dithionite and the current was not recovered (Fig. 4C) proving that NQ-channel chemical interaction was very important. This also suggests that Kv1.3 channel inhibition is not only controlled by the oxidant nature of the compounds, but could also have a structural component of the quinone that makes the difference.

In order to evaluate whether the inhibition of Kv1.3 by NQ is not only achieved through a redox process, but also due to important effects of the structure, some NQs were tested. These exhibit the NQ main structure but also have distinct chemical substituents. Four NQs were characterized by cyclic voltammetry (CV) to evaluate electronic effects of chemical substituents in redox potential and select the best candidates (lower and higher potential values) for further electrophysiological testing. Since some cellular electronic transference could take place in non-aqueous media, DMSO medium was used to emulate this environment. CV experiments for NQs in aqueous media were performed in parallel to simulate a hydrophilic environment where some interaction sites in ion channels could be located. Studies in both media are complementary and may help to understand the interaction between ion channels and NQs.

3.2. Electrochemical measurements

The NQ cyclic voltammograms in DMSO media were traced in positive and negative scan directions with similar conditions. Two typical reduction signals, Ic and IIc, (Fig. 5) were observed. This suggested

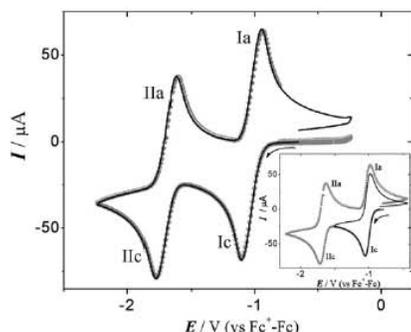
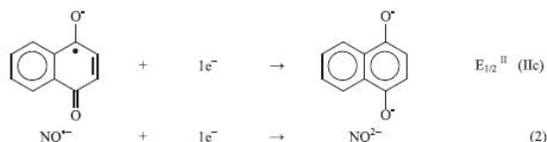
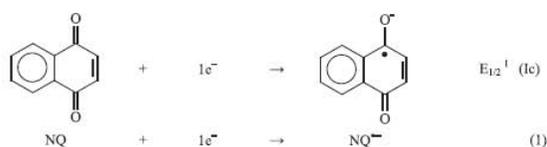


Fig. 5. Typical cyclic voltammograms of 6.3 mM NQ. They show traces obtained in negative (–) and positive (○) scan direction starting from OCP. The inset shows negative switching potentials, E_{s} , to verify the correspondence between reduction and oxidation signals Ic-Ia (–) and IIc-IIa (○). All curves were obtained at 0.1 V/s scan rate. 0.1 M $Bu_4NPF_6/DMSO$ was used as supporting electrolyte, E_w vitreous carbon (ϕ 7.1 mm²), E_A Pt⁺ and E_R non-aqueous AgCl/Ag.

one-electron transfer process in two stages, as previously described in literature [53]. The first step was assigned to reduction Eq. (1) and the second process to reduction Eq. (2), as shown below:



The correspondence between reduction and oxidation signals Ic-Ia and IIc-IIa was verified by the negative switching potential study (E_{s} , Fig. 5 inset). The electrochemical reversibility was analyzed by cyclic voltammograms obtained at variable potential scan rate in the range 0.010 to 1.00 V s⁻¹. The ratio values of $|i_{pc}/i_{pa}|$ were close to 1 and the expected difference between oxidation and reduction peak potentials $\Delta E_p \approx 60$ mV confirmed a reversible and mono electronic process for each reduction stage.

The additional NQs characterization (2NH₂NQ, 2MeONQ, 5OHNQ and 2SO₃KNQ) was carried out in the same way as for NQ. Results were similar and they also showed the typical reduction signals (Ic and IIc) and their corresponding oxidation (Ic-Ia and IIc-IIa) in the same potential range (0 to –2.5 V vs Fc⁺/Fc). Voltammograms are not shown.

Half-wave potential values, $E_{1/2}$, were estimated using Eq. (3) for all NQs, as shown in Table 1:

$$E_{1/2} = (E_{pa} + E_{pc})/2. \quad (3)$$

In the first reduction signal (Ic) for 2NH₂NQ (–NH₂ electrodonor group) and 2SO₃KNQ (–SO₃⁻ electroattractor group), the electronic effect was exhibited as $E_{1/2}$ modification versus NQ system. Similar

Table 1
1,4-naphthoquinone derivatives evaluated as putative potassium channel (Kv) inhibitors and estimated half-wave potentials ($E_{1/2}$)/V (Fc⁺/Fc) obtained in DMSO media and reduction peak potentials (E_p)/V (Fc⁺/Fc) obtained in ND-96 media.

Compound	DMSO		ND-96	
	$E_{1/2}$ (V)	$E_{1/2}^{II}$ (V)	E_{pc}^I (V)	E_{pa}^{II} (V)
2NH ₂ NQ	–1.296	–1.955	–0.64	–0.45
2MeONQ	–1.130	–1.896	*	*
NQ	–1.024	–1.699	–0.45	–0.23
2SO ₃ KNQ	–1.017	–1.634	*	*
5OHNQ	–0.842	–1.453	–0.43	–0.35

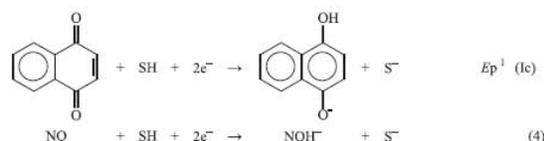
*Values not determined.

results were found by other authors [54–56]. Interestingly, the $E_{1/2}$ potential difference between compounds 2NH₂NQ and 5OHNQ was the greatest, despite the fact that both substituents (–NH₂ and –OH) are electrodonors. This could be explained by intramolecular hydrogen bonding that stabilizes the radical anion 5OHNQ^{•-} [57–60] and seems to be more important than electronic effects.

Assays with hydrogen peroxide, NQ or sodium dithionite, showed that Kv1.3 channel inhibition is not only controlled by redox nature of the tested compounds. On the other hand, the electrochemical results in DMSO medium indicate a direct dependence of redox potential on NQ chemical substituent. So, the first electronic transference potential value in DMSO ($E_{1/2}^I$) was used to select NQ derivatives for electrophysiological assays. The 2NH₂NQ and 5OHNQ were selected because they have the greatest potential difference ($\Delta E_{1/2}^I$).

Since electrophysiological recording requires an aqueous medium with buffered ionic strength and specific chemical composition, ND–96, the reduction potential of the selected candidates (NQ, 2NH₂NQ and 5OHNQ) was determined in this medium. In such conditions, the typical cyclic voltammogram for NQ shows only one reduction and the corresponding oxidation signal (Ic-Ia, respectively, Fig. 6). The reduction peak potential E_{pc} value for NQ was –0.45 V vs Fc⁺/Fc.

The electrochemical behavior of NQ in aqueous media, considered as proton donor system (SH, protic solvent), shows a change in reduction mechanism, as reported previously [58–60]. The change from one to two electronic transfer processes observed can be attributed to coupled reaction with solvent molecules during the reduction process [60]. The NQ reduction in aqueous media was a one-stage, two-electron transfer process as previously described [37] and shown in Eq. (4):



The 2NH₂NQ and 5OHNQ compounds were characterized in the same way as NQ. The 2NH₂NQ has an electrochemical behavior similar to NQ: only one reduction signal of two-electron transfer and one oxidation signal associated with the protonated dianion (2NH₂NQH⁻), at potential values more positive than those observed for the anion radical. The difference between cathodic and anodic peak potentials ΔE_p is approximately 140 mV. Meanwhile the 5OHNQ shows a two-electron transfer and a quasi-reversible process was observed too ($\Delta E_p = 70$ mV). This suggests the stabilization of protonated dianion (5OHNQH⁻) by intramolecular hydrogen bonding [37]. The corresponding cathodic peak potential values (E_{pc}) were evaluated (Table 1) and they kept the same order as $E_{1/2}$ values in DMSO. However, the potential difference between them is low, 210 mV.

The results in DMSO and ND-96 media show that structural effects are important for NQs redox properties, and they could be related to

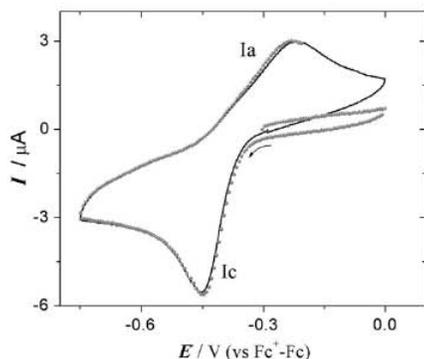


Fig. 6. Typical cyclic voltammograms of 100 μM NQ obtained in negative (—) and positive (---) scan direction starting from OCP. All curves were obtained at 0.1 V/s scan rate in ND-96 aqueous media as supporting electrolyte, E_w vitreous carbon (ϕ 7.1 mm²), E_A Pt⁺ and E_R aqueous AgCl/Ag electrode.

Kv1.3 inhibition. To verify this observation, electrophysiological assays were carried out with the 2NH₂NQ, NQ and 5OHNQ on Kv1.3 or ShIR channels.

3.3. Electrophysiological assays of selected NQs

The previous results demonstrated that not only the oxidant nature of NQ was important for Kv1.3 inhibition, but also its structure. Moreover, the CV assays in ND-96 media confirmed that naphthoquinone redox properties were modified by different chemical substituents. Now, since the goal of this study is to determine the possible relationship between the naphthoquinone structural properties, its redox potential and potassium current modulation of ion channels, NQ, 2NH₂NQ and 5OHNQ were tested by electrophysiological assays with TEV.

In the experiments, the I_{control} was measured with a pulse potential of +60 mV from a holding potential of -60 mV during 200 ms. The inhibition percentage for naphthoquinone tested in both channels is shown in Fig. 7.

The results in Fig. 7A show that NQs inhibit unequivocally outward Kv1.3 potassium currents in close accordance with quinone redox potential values (see redox potential scale in Fig. 7). The

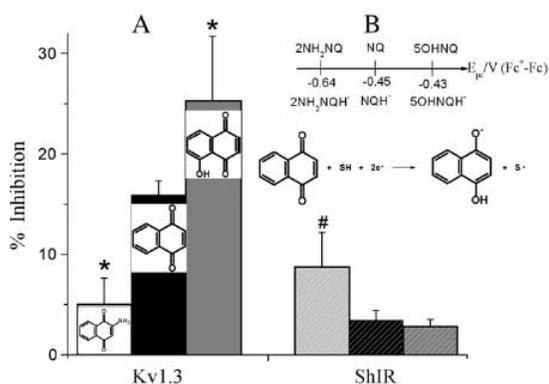


Fig. 7. Inhibition percentage of potassium outward currents for Kv1.3 (A) and ShIR (B) channels by addition of 100 μM NQs (NQ, 2NH₂NQ and 5OHNQ). The inhibition was calculated as $\{(I_{\text{control}} - I_{\text{NQ}}) / I_{\text{control}}\} \cdot 100$. Currents were measured at the end of the applied pulse. The holding potential was -60 mV and the oocytes were stimulated to +60 mV (200 ms duration). Data show the inhibition mean \pm SD (*, #p < 0.05 versus NQ, n = 4). The upper part displays the scale for the first reduction potential values for NQs obtained in aqueous media (ND-96), for conditions see Fig. 6.

highest inhibitory effect on Kv1.3 currents was observed with the most oxidant naphthoquinone (5OHNQ). The effect decreased significantly with the least oxidant naphthoquinone (2NH₂NQ). So, the inhibitory effect on Kv1.3 increased with the oxidant power of NQs. On the other hand, on ShIR currents the opposite effect was barely observed (Fig. 7B). The lowest inhibition was observed when 5OHNQ was added to the recording chamber. ShIR inhibition effect was increased when the oxidant power of NQs decrease, but was not statistically different in terms of data variance analysis.

Results have shown that both the oxidant nature and the structural determinants are important factors in NQ regulation of ion channels. It is interesting that even both channels belong to the same family (Kv1.x), each protein shows striking differences in modulation. This suggests that more specific and finer tuning should occur between the NQ derivatives and ion channel. In an attempt to explain this hypothesis, a detailed analysis was done for primary sequences in both channels. The SDSC-Biology WorkBench on-line program (version 3.2) was used to align both sequences. Fig. 8 shows the amino acid alignment for both channels and to elaborate a detailed analysis of interaction sites, some highlights were made. Transmembrane domains are boxed and external loops are labeled up each sequence segments and internal loops below. Identical residues are in bold and similar are in italics. All the cysteine and methionine residues are black boxed, aromatic residues in the S5-loop-S6, the serine and acidic rich regions are underlined.

First, the external vestibule of the pore domain (P) has an important difference: Kv1.3 channel has two glycines (G) while ShIR has phenylalanine (F) and tryptophan (W). NQs could intercalate between aromatic residues by π interactions impeding its direct redox activity with ion channel. Additionally, other extracellular sites in ShIR were identified where aromatic amino acids are present (see loop A1). This explains the possible interaction between ion channel and the NQs showed in the electrophysiological results, the redox effects are described below.

Second, the extracellular loop A3 includes a methionine residue in both channels (Fig. 8). While in ShIR channel this loop has 28 residues, in Kv1.3 only 14. Methionine and cysteine are the most reactive redox sites and their oxidation modifies ion channels activity [26,50,61,62]. In Kv1.3 the methionine residue is more exposed and therefore, prone to oxidize; but in ShIR the analogous residue is less exposed and its oxidation is less likely [50]. This could also explain the differences observed in electrophysiological assays between ion channels and NQs.

Finally, at end of the A1 loop ShIR channel has an acidic-rich region (a-rich region = EEDExxDxxD), while Kv1.3 channel has a serine-rich region (S-rich region = SxSxxSxxSxxS) in the same zone (Fig. 8). At physiological pH glutamic E and aspartic D amino acids are deprotonated (pK_as 4.0 and 4.3, respectively) giving them negative charges. This leads to electrostatic repulsion [10] between the NQs and the loop, nullifying their activity. In other hand, for Kv1.3 the hydroxyl groups of serine-rich region interact with the carbonyl of NQ system, favoring the hydrogen bonding and NQ reduction by decreasing the redox potential [37,58–60]. The electrochemical and electrophysiological results explain the structural effects on oxidant nature of NQs and their role on irreversible current inhibition of Kv1.3.

4. Conclusions

This is the first time that the electrochemical characterization of NQs is achieved in physiological conditions (ND-96 medium). Electrochemical measurements demonstrated that the relationship between redox potential and electronic properties of naphthoquinone core was kept in both media (hydrophilic and hydrophobic). However, NQs reducing mechanism was dramatically modified. Electrophysiological measurements showed that Kv1.3 current inhibition was dependent on NQs redox potential. Opposite to this, ShIR did not

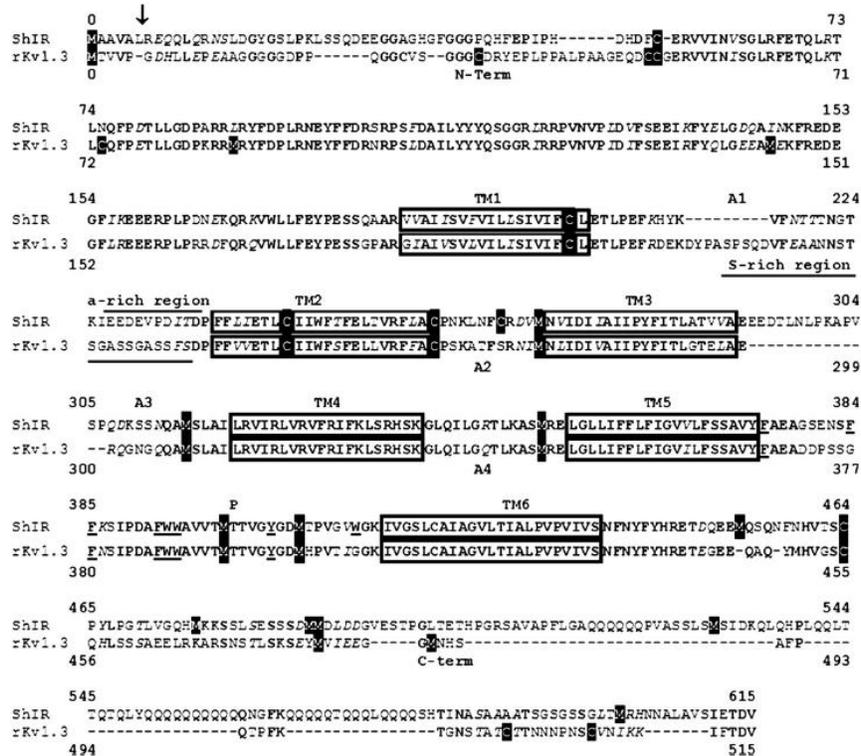


Fig. 8. Amino acid sequence alignment of ShIR and rKv1.3 channels. The ShIR is a short form where 41 amino acids ($\Delta 6-46$) were removed to eliminate the inactivation domain (down arrow mark). Putative sites of reaction with redox agents, cysteine (C) and methionine (M) residues are black boxed; identical, in bold and similar, in italics. Transmembrane domains (TM) are boxed and loops (A) are labeled up for external and below for internal. Aromatic residues in the S5-loop-S6, the serine rich region (s-rich region) and acidic-rich region (a-rich region) are underlined. The pore is indicated as (P) above the signature sequence.

show significant activity. This could be explained by a possible interaction between NQs with some residues in channel sequence. Based on electrophysiological recordings, electrochemical assays and amino acid sequence analysis, the inhibition of Kv1.3 currents by naphthoquinone could be intimately related to redox potential and its structure. According to the conservation of amino acid sequences in both channels NQ interaction with Kv1.3 can be justified specifically for the quinone functional group and its redox potential. This work is pioneer in applying electrochemical and electrophysiological techniques to demonstrate that redox potential and molecular structure are related to ion channel modulation. An important contribution of this work is the electrochemical strategy used to simulate cellular environments (aqueous and non-aqueous) that NQs may face. This strategy could be employed to simply and finely pre-select the best compounds for electrophysiological assays.

Acknowledgments

T. R.-F. thanks the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-México) for Ph.D. financial support. J. G.-V. thanks DGAPA-PAPIIT for grant IN215508. Authors are grateful to Professors Olaf Pongs (University-Hospital Eppendorf) and Ligia Toro (David Geffen School of Medicine at UCLA) for rKv1.3 and ShIR clones, respectively. Authors appreciate Professor L.D. Possani (Instituto de Biotecnología, UNAM), for the use of the equipment; and Professor Rafael Moreno for helpful discussions of the results.

References

- [1] D.J. Aidley, P.R. Stanfield, Ion Channel Molecules in Action, Cambridge University Press, New York, 1996.
- [2] C. Miller, 1990 annus mirabilis of potassium channel, *Science* 252 (1990) 1092–1096.
- [3] O. Pongs, Molecular biology of voltage-dependent potassium channel, *Phys. Rev.* 72 (1992) S69–S88.
- [4] J. Weng, Y. Gao, N. Moss, M. Zhou, Modulation of voltage-dependent Shaker family potassium channels by an aldo-keto reductase, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 15194–15200.
- [5] L.I. Escobar, J.C. Martínez-Téllez, M. Salas, S.A. Castilla, R. Carrisoza, D. Tapia, M. Vázquez, J. Vargas, J.J. Bolívar, A voltage-gated K(+) current in renal inner medullary collecting duct cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 286 (2004) 965–974.
- [6] L. Tu, A. Helm, W. Skach, C. Deutsch, Transmembrane biogenesis of Kv1.3, *Biochemistry* 39 (2000) 824–836.
- [7] J.M. Sabatier, D. Bernard, M. Crest, J. Devaux, A. Benoliel, M. Gola, C. Beeton, J. Barbara, P. Giraud, E. Béraud, Inhibits T cell activation autoimmune encephalomyelitis and + channels improves experimental selective blocking of voltage-gated K, *J. Immunol.* 166 (2001) 936–944.
- [8] C. Beeton, M.W. Pennington, H. Wulff, S. Singh, D. Nugent, G. Crossley, I. Khaytin, P.A. Calabresi, C. Chen, G.A. Gutman, K.G. Chandy, Targeting effector memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1.3 channels for therapy of autoimmune diseases, *Mol. Pharmacol.* 67 (2005) 1369–1381.
- [9] N. Abbas, M. Belghazi, Y. Mottaleb, J. Tytgat, P. Bougis, M. Martin-Eauclaire, A new Kallitoxin selective towards Kv1.3 and Kv1.2 but not Kv1.1 channels expressed in oocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 376 (2008) 525–530.
- [10] J. Aiyar, J. Withka, J. Rizzi, D. Singleton, G. Andrews, W. Lin, J. Boyd, D. Hanson, M. Simon, B. Dethlefs, C. Lee, J. Hall, G. Gutman, K. Chandy, Topology of the pore-region of a K⁺ channel revealed by the NMR-derived structures of scorpion toxins, *Neuron* 15 (1995) 1169–1181.
- [11] M.A. Doczi, A.D. Morielli, D.H. Damon, Kv1.3 channels in postganglionic sympathetic neurons: expression, function, and modulation, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295 (2008) R733–R740.

- [12] H. Rauer, S. Grissmer, The effect of deep pore mutations on the action of phenylalkylamines on the Kv1.3 potassium channel, *Br. J. Pharmacol.* 127 (1999) 1065–1074.
- [13] X. Wang, Y. Liao, A. Zou, L. Li, D. Tu, Blockade action of ketanserin and increasing effect of potassium ion on Kv1.3 channels expressed in *Xenopus* oocytes, *Pharm. Res.* 56 (2007) 148–154.
- [14] Z. Kuras, S. Grissmer, Effect of K⁺ and Rb⁺ on the action of verapamil on a voltage-gated K⁺ channel, *hKv1.3*: implications for a second open state? *Br. J. Pharmacol.* 157 (2009) 757–768.
- [15] J. Chen, V. Avdonin, M.A. Ciorba, S.H. Heinemann, T. Hoshi, Acceleration of P/C-type inactivation in voltage-gated K1 channels by methionine oxidation, *Biophys. J.* 78 (2000) 174–187.
- [16] M.A. Ciorba, S.H. Heinemann, H. Weissbach, N. Brot, T. Hoshi, Regulation of voltage-dependent K channels by methionine oxidation: effect of nitric oxide and vitamin C, *FEBS Lett.* 442 (1999) 48–52.
- [17] P. Navas, J.M. Villalba, R. Cabo, The importance of plasma membrane coenzyme Q in aging and stress response, *Mitochondrion* 75 (2007) 534–540.
- [18] N.R. Bachur, S.L. Gordon, M.V. Gee, A general mechanism for microsomal activation of quinone anticancer agents to free radicals, *Cancer Res.* 38 (1978) 1745–1750.
- [19] M.O.F. Goulart, C.L. Zani, J. Tonholo, L.R. Freitas, F.C. de Abreu, A.B. Oliveira, D.S. Raslan, S. Starling, E. Chiari, Trypanocidal activity and redox potential of heterocyclic and 2-hydroxy-naphthoquinones, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 7 (1997) 2043–2048.
- [20] C. Shen, W. Syu, S. Li, Ch. Li, G. Lee, Ch. Sun, Antimicrobial activities of naphthazarins from *Arnebha euchroma*, *J. Nat. Prod.* 65 (2002) 1857–1862.
- [21] G. Meazza, F.E. Dayan, D.E. Wedge, Activity of quinones on *Colletotrichum* species, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 3824–3828.
- [22] S.A. Petrova, M.V. Kolodyazhny, O.S. Ksenzhek, Electrochemical properties of some naturally occurring quinones, *J. Electroanal. Chem.* 277 (1990) 189–196.
- [23] A. Brunmark, E. Cadena, Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications, *Free Radic. Biol. Med.* 7 (1989) 435–477.
- [24] A. Begleiter, G.W. Blair, Quinone induces DNA damage and its relationship to antitumor activity in L5178Y lymphoblast, *Cancer Res.* 44 (1984) 78–82.
- [25] A.A. Fisher, M.T. Labenski, S. Malladi, V. Gokhale, M.E. Bowen, R.S. Milleron, S.B. Bratton, T.J. Monks, S.S. Lau, Quinone electrophiles selectively adduct "Electrophile binding Motifs" within cytochrome C, *Biochemistry* 47 (2007) 11090–110100.
- [26] Y. Shechter, Selective oxidation and reduction of methionine residues in peptides and proteins by oxygen exchange between sulfoxide and sulfide, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 66–70.
- [27] M.D. Evans, W.A. Pryor, Damage to human a-1-proteinase inhibitor by aqueous cigarette tar extracts and the formation of methionine sulfoxide, *Chem. Res. Toxicol.* 5 (1992) 654–660.
- [28] W. Feng, G. Liu, R. Xia, J. Abramson, I. Pessah, Site-selective modification of hyper-reactive cysteines of ryanodine receptor complex by quinones, *Mol. Pharmacol.* 55 (1999) 821–831.
- [29] C.T. Schulteis, S.A. John, Y. Huang, C. Tang, D.M. Papazian, Conserved cysteine residue in the Shaker K⁺ channel is not linked by disulphide bond, *Biochemistry* 34 (1995) 1725–1733.
- [30] N. Brot, H. Weissbach, Biochemistry and physiological role of methionine sulfoxide residues in proteins, *Arch. Biochem. Biophys.* 223 (1983) 271–281.
- [31] E. Balog, E. Lockamy, D. Thomas, D. Ferrington, Site specific methionine oxidation initiates calmodulin degradation by the 20S proteasome, *Biochemistry* 48 (2009) 3005–3016.
- [32] N. Gupta, H. Linschitz, Hydrogen-bonding and protonation effects in electrochemistry of quinones in aprotic solvents, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 6384–6391.
- [33] D. Pletcher, H. Thompson, A microelectrode study of the influence of electrolyte on the reduction of quinones in aprotic solvents, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 94 (1998) 3445–3450.
- [34] M. Aguilar-Martínez, N. Macías-Ruvalcaba, J.A. Bautista-Martínez, M. Gómez, F.J. González, I. González, Review: hydrogen bond and protonation as modifying factors of the quinone reactivity, *Curr. Org. Chem.* 8 (2004) 1721–1738.
- [35] M. Aguilar-Martínez, J.A. Bautista-Martínez, N. Macías-Ruvalcaba, I. González, E. Tovar, T. Marín del Alizal, O. Collera, G. Cuevas, Molecular structure of substituted phenylamine α -OMe- and α -OH-*p*-benzoquinone derivatives. Synthesis and correlation of spectroscopic, electrochemical and theoretical parameters, *J. Org. Chem.* 66 (2001) 8349–8363.
- [36] J.A. Bautista-Martínez, I. González, M. Aguilar-Martínez, Correlation of voltammetric behavior of α -hydroxy and α -methoxy quinones with the change of acidity level in acetonitrile, *J. Electroanal. Chem.* 573 (2004) 289–298.
- [37] M. Gómez, F.J. González, I. González, Intra and intermolecular hydrogen bonding effects in the electrochemical reduction of α -phenolic-naphthoquinones, *J. Electroanal. Chem.* 578 (2005) 193–202.
- [38] J. Inbaraj, C. Chignell, Cytotoxic action of juglone and plumbagin: a mechanistic study using HaCaT keratinocytes, *Chem. Res. Toxicol.* 17 (2004) 55–62.
- [39] L. Hernández-Muñoz, M. Gómez, F. González, I. González, C. Frontana, Towards a molecular-level understanding of the reactivity differences for radical anions of juglone and plumbagin: an electrochemical and spectroelectrochemical approach, *Org. Biomol. Chem.* 7 (2009) 1896–1903.
- [40] H. Weiss, T. Friedrich, G. Hofhaus, D. Preis, The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondrion, *Eur. J. Biochem.* 197 (1991) 563–576.
- [41] S. Sanchez, A. Arratia, R. Urdova, H. Gomez, R. Schreiber, Electron transport in biological processes II: electrochemical behavior of Q₁₀ immersed in a phospholipidic matrix added on a pyrolytic graphite electrode, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 36 (1995) 67–71.
- [42] W. Stühmer, J.P. Ruppersberg, K.H. Schröter, B. Sakmann, M. Stocker, K.P. Giese, A. Perschke, A. Baumann, O. Pongs, Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian, *EMBO J.* 8 (1989) 3235–3244.
- [43] T. Hoshi, W.N. Zagotta, R.W. Aldrich, Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation, *Science* 250 (1990) 533–538.
- [44] W.N. Zagotta, T. Hoshi, R.W. Aldrich, Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB, *Science* 250 (1990) 568–571.
- [45] T.M. Shih, R.D. Smith, L. Toro, A.L. Goldin, High-level expression and detection of ion channels in *Xenopus* oocytes, *Meth. Enzymol.* 293 (1998) 529–556.
- [46] W. Stühmer, Electrophysiological recordings from *Xenopus* oocytes, *Meth. Enzymol.* 207 (1992) 319–339.
- [47] W. Stühmer, Electrophysiological recordings from *Xenopus* oocytes, *Meth. Enzymol.* 293 (1998) 280–300.
- [48] G. Gritzner, J. Küta, Physical and biophysical chemistry division commission on electrochemistry, *Pure Appl. Chem.* 4 (1984) 461–466.
- [49] V. Petronilli, P. Constantini, L. Scorrano, R. Colonna, S. Passamonti, P. Bernardi, The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 16638–16642.
- [50] W. Vogt, Oxidation of methionyl residues in proteins; tools, targets and reversal, *Free Radic. Biol. Med.* 18 (1995) 93–105.
- [51] T. Kayashima, M. Mori, H. Yoshida, Y. Mizushima, K. Matsubara, 1,4-Naphthoquinone is a potent inhibitor of human cancer cell growth and angiogenesis, *Cancer Lett.* 278 (2009) 34–40.
- [52] P. Schopfer, E. Heyno, F. Drepper, A. Krieger-Liszky, Naphthoquinone-dependent generation of superoxide radicals by quinone reductase isolated from the plasma membrane of soybean, *Plant Physiol.* 147 (2008) 864–878.
- [53] D.B. Raoof, S.M. Golabi, Electrochemical properties of carbon-paste electrodes spiked with some 1,4-naphthoquinone derivatives, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 68 (1995) 2253–2261.
- [54] T. Rodríguez-Fernández, J. García-Valdés, V. Ugalde-Saldívar, I. González, Electrochemical study of phenolic and quinoid derivatives with putative activity on ion channels, *ECS Trans.* 15 (2008) 335–343.
- [55] J.E. Heffner, C.T. Wigal, O.A. Moe, Solvent dependence of the one-electron reduction of substituted benzo- and naphthoquinones, *Electroanalysis* 9 (1997) 629–632.
- [56] C. Frontana, A. Vázquez-Mayagoitia, J. Garza, R. Vargas, I. González, Substituent effect on a family of quinones in aprotic solvents: an experimental and theoretical approach, *J. Phys. Chem. A* 110 (2006) 9411–9419.
- [57] F.J. González, Cyclic voltammetry of two analogue K-group vitamin compounds in dimethylsulfoxide, *Electroanalysis* 10 (1998) 638–642.
- [58] M. Gómez, F.J. González, I. González, A model for characterization of successive hydrogen bonding interactions with electrochemically generated charged species. The quinone electroreduction in the presence of donor protons, *Electroanalysis* 15 (2003) 635–645.
- [59] B.R. Eggins, J.Q. Chambers, Proton effects in the electrochemistry of the quinone hydroquinone system in aprotic solvents, *J. Electrochem. Soc.* 117 (1970) 186–192.
- [60] P.D. Astudillo, J. Tiburcio, F.J. González, The role of acids and bases on the electrochemical oxidation of hydroquinone: hydrogen bonding interactions in acetonitrile, *J. Electroanal. Chem.* 604 (2007) 57–64.
- [61] Z. Wang, M. Nara, Y. Wang, M. Kotlikoff, Redox regulation of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel in smooth muscle cells, *J. Gen. Physiol.* 110 (1997) 35–44.
- [62] S. Hepp, F.J. Gerich, M. Müller, Sulfhydryl oxidation reduces hippocampal susceptibility to hypoxia-induced spreading depression by activating BK channel, *J. Neurophysiol.* 94 (2005) 1091–1103.

Electrochemical Study of Phenolic and Quinoid Derivatives with Putative Activity on Ion Channels

T. Rodríguez-Fernández^a, J. García-Valdés^a, V. Ugalde-Saldívar^b, I. González^c

^a Facultad de Química, Departamentos de Química Analítica y ^b Química Inorgánica y Nuclear, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., 04510, México.

^c Departamento de Química-Área de Electroquímica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México D.F., 09340, México.

Conduction across ion channels is fundamental for many physiological processes. BK channel is modulated by several stimuli as calcium, ATP, naphthoquinones and thymol; the last two develop opposite action: decreasing or increasing ion flow. These effects could be explained because both compounds have different redox properties: naphthoquinones as oxidants and thymol as reductant. Redox potential for these compounds could be modified by different substituent addition, thus, five naphthoquinone and four phenolic derivatives were selected to be studied by cyclic voltammetry. Compounds as 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone versus 2-amine-1,4-naphthoquinone and 2-isopropyl-5-methyl-phenol (thymol) versus 2,4,6-trimethyl-phenol showed the largest difference in peak potential. Then, these compounds will be considered to assess their action by electrophysiological trials on BK channel. At this moment only the study with thymol was carried out and it was found, for the first time, an increase in BK channel currents expressed in *Xenopus* oocytes.

Introduction

Ion channels are fundamental molecular machines related to very diverse biological functions, some of them are metabolic regulation, hormonal secretion or electrical excitability of the nervous system. They are integral membrane proteins that form aqueous pores which open or close in response to a specific stimulus as: change in membrane potential, mechanical stress, and intra- or extracellular ligand binding. Once the channel opened, ions like Na⁺, K⁺, Ca²⁺ or Cl⁻ selectively permeate through the lipid bilayer. The voltage-calcium-dependent K⁺ channel (MaxiK or BK) is one of the most studied due to his ubiquity and implications in cell physiology (1-3). BK channel pharmacology is vast, and the modulator's nature is diverse: mono- and divalent inorganic cations, peptides, steroids, among others. Some papers report that compounds with redox properties modulate BK channel activity. Natural reductant molecules: phenolic, as thymol (4) and caffeic acid phenethyl ester (5); and primary alcohols (6), as diosgenin (7), increase BK currents when they are applied to the bath solution. It is known that most of them have also antioxidant activity. As counterpart, some oxidant compounds such as 2-mercaptophenyl-1,4-naphthoquinone and 1,4-naphthoquinone (8) have the opposite effect and decrease BK channel currents. The action of activators or inhibitors could be associated to their redox properties. It is well known that the reactivity of phenolic and quinoid molecules is modulated by electrodonor or electroattractor

substituents (9-15). Therefore an electrochemical study for putative inhibitors or activators such as 1,4-naphtoquinones or phenolic derivatives (Table I and II) is a must in order to correlate between electronic properties and the BK channel current modulation. This study is important since redox properties for the involved species could be an indicator of the association energy between these compounds and ion channels.

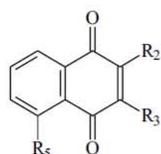


TABLE I. 1,4-naphtoquinone derivatives evaluated as possible BK channel current inhibitors

Compound	R ₂	R ₃	R ₅
1 1,4-naphtoquinone	H	H	H
2 2-amine-1,4-naphtoquinone	NH ₂	H	H
3 2-methoxy-3-methyl-1,4-naphtoquinone	OCH ₃	CH ₃	H
4 5-hydroxy-1,4-naphtoquinone	H	H	OH
5 1,4-naphtoquinone-2-sulphonic acid potassium salt	SO ₃ ⁻ K ⁺	H	H

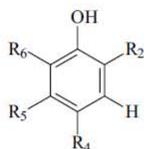


TABLE II. Phenolic derivatives tested as putative BK channel current activators

Compound	R ₂	R ₄	R ₅	R ₆
6 2-isopropyl-5-methyl-phenol (thymol)	CH(CH ₃) ₂	H	CH ₃	H
7 2-tert-butyl-4-methyl-phenol	C(CH ₃) ₃	CH ₃	H	H
8 2,4,6-trimethyl-phenol	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
9 2,6-di-tertbutyl-4-methyl-phenol	C(CH ₃) ₃	CH ₃	H	C(CH ₃) ₃

Materials and Methods

As the first part of this investigation, an electrochemical study was performed with five 1,4-naphtoquinone (Table I) and four phenolic (Table II) derivatives; all of these chemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich and used without further purification.

Electrochemical measurements

A conventional three-electrode cell, inside to a BAS C2 Faraday cage, was used to perform electrochemical experiments. The electrodes employed were: a vitreous carbon disk (7.1 mm²) as working electrode, E_W; a platinum wire as auxiliary electrode, E_A; and a Ag/AgCl couple in tetrabutylammonium chloride (Fluka) Bu₄NCl, 0.1 M in DMSO (Aldrich, HPLC anhydrous) as reference electrode, E_R. In all experiments E_R was separated from conductive media by a Vycor membrane. Freshly prepared tetrabutylammonium hexafluorophosphate (Fluka) Bu₄NPF₆, 0.1 M in DMSO, was used as supporting electrolyte. All potential values in this study are reported versus the ferricinium/ferrocene system (Fc⁺/Fc) according to the IUPAC recommendation (16). This system potential value was 0.835 V versus the non aqueous Ag/AgCl reference electrode.

Solutions were prepared by solving compounds approximately to 1 mg/mL in inert electrolyte to get final concentrations of 6.3, 5.8 5.0, 5.7, 3.6 mM for **1**, **2**, **3**, **4** and **5** for naphtoquinone derivatives and 6.7, 6.1, 7.4, 4.5 mM for **6**, **7**, **8** and **9** phenolic derivatives respectively. All solutions were prepared using dry DMSO and were previously deoxygenated for at least five minutes and the cell was kept under nitrogen atmosphere during the experiment.

All voltammetric curves were carried out using a PAR-283 potentiostat/galvanostat. Data acquisition was performed by PowerSuite v2.56 software in a computer interfaced

with a GPIB-USB-HS (National Instruments). Data was processed and corrected via ohmic compensation using Origin 6.0 (Microcal) program employing the obtained R_u value (745Ω) by uncompensated resistance determination. Voltammograms were traced starting from the Open Circuit Potential, OCP.

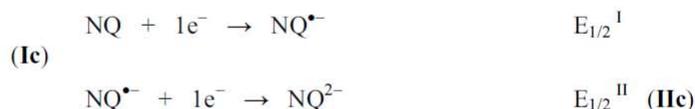
Electrophysiological measurements

A pGEM vector subcloned with cDNA that code for the gene of the human large conductance calcium and voltage-dependent K^+ -channel, was amplified using conventional molecular biology protocols (17). cRNA for BK α subunit was synthesized using mMessage mMachine *in vitro* transcription kit (Ambion) and was injected into *Xenopus laevis* oocytes using 1~2 ng (heterologous expression). Potassium currents were recorded 2~4 days after cRNA injection. The bath solution was ND-96 (mM): 96, NaCl; 2, KCl; 1.8, $CaCl_2$; 1, $MgCl_2$; and 5, HEPES (pH 7.0, with NaOH). Resistance for the voltage and current electrodes were 0.3-0.5 and 1.0-1.5 $M\Omega$, respectively, when filled with 3 M KCl solution. Macroscopic currents were recorded using the CA1B amplifier (Dagan Corporation). Holding potential was -60 mV and test pulses were applied from -60 to +80 in 20 mV steps during 200 ms. Acquisition and data analysis were performed with pClamp 10.2 (Axon Instruments) and Origin 6.0 respectively. Currents were filtered at 1/5 of the sampling frequency. Activity for compounds was evaluated after 2 minutes of application. The perfusing volume of washing solutions was about 20 times greater than chamber capacity.

Results and Discussion

Study of 1,4-naphthoquinone (I) and derivatives (2-5).

Two typical waves (**I** and **II**) are observed in the voltammetric characterization of the naphthoquinone system (NQ) **I**, this suggests two-stage mono-electronic reduction process as previously described in literature (10):



Voltammograms are traced in anodic and cathodic direction with similar conditions in both scans. Electrochemical behavior is equal in traces (Figure 1). The correspondence between reductive (cathodic) and oxidative (anodic) signals **Ic-Ia** and **IIc-IIa** are verified by the cathodic potential switching values, $E_{\lambda-}$, (Inset figure 1). The evaluation of electrochemical reversibility for the naphthoquinone system was carried out at different scan rates. The cathodic and anodic peak current ratio $|i_{pc}/i_{pa}|$ was near to 1 and signals **Ic** versus **Ia** and **IIc** versus **IIa** are separated by ~60 mV at $v \leq 1 \text{ Vs}^{-1}$. These results suggest reversibility in both mono electronic signals (18).

Characterization for the rest naphthoquinone derivatives was performed in the same way as the non substituted naphthoquinone system. The electrochemical behavior is similar since they also showed the typical reduction and oxidation signals **I** and **II** and its

correspondence between **Ic-Ia** and **Iic-IIa** signals. Electrochemical reversibility and two mono electronic processes were confirmed.

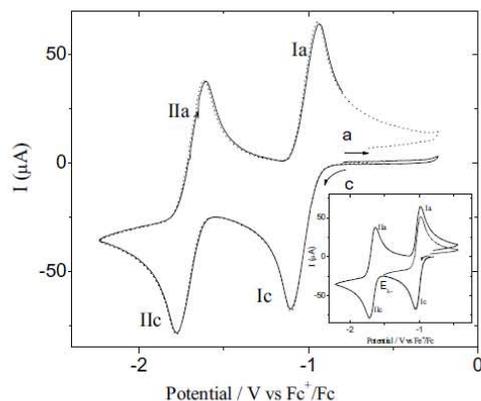


Figure 1. Typical 1,4-naphthoquinone (6.3 mM) voltammograms showed traces obtained in cathodic (c) and anodic (a) direction starting from OCP (inset cathodic switching potentials, E_{λ}) to verify the correspondence between reduction and oxidation signals for **Ic-Ia** and **Iic-IIa**. All curves were obtained at scan rate 0.1 V/s. 0.1 M $\text{Bu}_4\text{NPF}_6/\text{DMSO}$ as supporting electrolyte, E_W vitreous carbon (ϕ 7.1 mm^2), E_A Pt° and E_R non-aqueous Ag/AgCl .

Half-wave potential values, $E_{1/2}$, were estimated for all naphthoquinone derivatives using the equation [1] and they are presented in the table III.

$$E_{1/2} = (E_{pa} + E_{pc})/2 \quad [1]$$

TABLE III. Estimated half-wave potentials for the 1,4-naphthoquinone derivatives in $\text{V}/\text{Fc}^+/\text{Fc}$

Compound	$E_{1/2}^I$ (V)	$E_{1/2}^{II}$ (V)
2 2-amine-1,4-naphthoquinone	-1.296	-1.955
3 2-methoxy-3-methyl-1,4-naphthoquinone	-1.130	-1.896
1 1,4-naphthoquinone	-1.024	-1.699
5 1,4-naphthoquinone-2-sulphonic acid potassium	-1.017	-1.634
4 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone	-0.842	-1.453

The differences in potential, for signal **I**, are approximately of 270 mV with respect of naphthoquinone system **1** ($E_{1/2}^I = -1.024$ V). The largest potential difference was found between naphthoquinones **2** and **4**.

Several reports state that quinone, Q, system activity is related to its capacity to accept one or two electrons that produce their corresponding radical anion or dianion ($\text{Q}^{\bullet-}$ and Q^{2-}) respectively. Thus, the $\text{Q}/\text{Q}^{\bullet-}/\text{Q}^{2-}$ system properties depend directly on their original chemical structure, which can be modified by addition of different derivatives in the non substituted quinone. Substituent electronic effects are key factor since they will affect redox properties for the general structure (9-15); that might depend on substituents position in the quinone structure. Some authors demonstrated that electrodonor groups induce an electronic shielding in the molecule structure causing a shifting in $E_{1/2}$ values

to cathodic direction. Opposite to that, electroattractor groups modified $E_{1/2}$ values to anodic direction (12, 13, 19).

Thus, compounds **2** and **5** were compared because they differ only by substituent in position R_2 ($-NH_2$ and $SO_3^-K^+$ respectively). The changes in electronic shielding forced an $E_{1/2}$ shifting (cathodic or anodic) for compounds **2** and **5** versus **1** ($E_{1/2}^I = -1.296, -0.842, -1.024$ V respectively). The $-NH_2$ group in compound **2** induces an electrodonor effect which displaces $E_{1/2}$ to more negative values, while in compound **5** the less negative value is attributed to the sulphonate electroattractor effect. On the other hand, several reports explain an anodic shifting due to the intramolecular hydrogen bond formation during the first quinone reduction, which is facilitated by the presence of a neighbor hydroxyl group to carboxylic oxygen (10). This effect is observed in compound **4**.

Besides to the previous observation, a bigger difference in reduction potential values for the studied naphthoquinones, could be attributed to *i*) the electrodonor effect in naphthoquinone system by the amine group and *ii*) the intramolecular hydrogen bonding due to the hydroxyl group. So, the substituent nature may have an effect on BK channel modulation because the redox potential was modified.

Study of phenolic derivatives (6-9).

Cyclic voltammograms are obtained in cathodic and anodic scans, similar conditions, to assure identical electrochemical behavior. Opposite to naphthoquinone studies, voltammograms were traced several times because it is known that phenols show strong adsorption at electrode (20, 21). When the potential scan is initiated in anodic direction (starting from OPC), voltammograms showed a typical single anodic current peak for phenolic compounds **Ia** and two or three reduction signals **IIc**, **IIIc** and **IVc**. Meanwhile in cathodic direction, only anodic signal **Ia** was observed (Figure 2). Since different signals were found in both scans, an anodic switching potential study, $E_{\lambda+}$, was carried out to verify the correspondence between **Ia** oxidation and **IIc**, **IIIc** and **IVc** reduction currents (Figure 3).

ECS Transactions, 15 (1) 335-343 (2008)

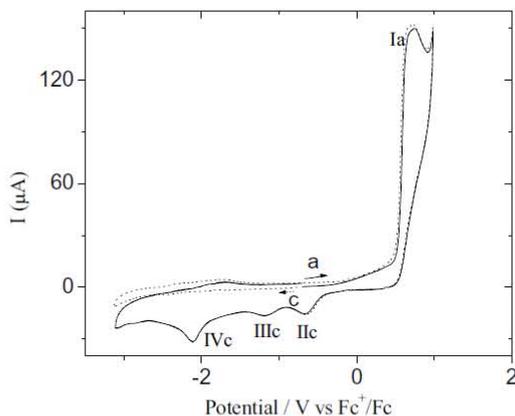


Figure 2. Cyclic voltammograms for 2-tert-butyl-4-methylphenol 6.1 mM, obtained in cathodic (c) and anodic (a) direction starting from OCP at 0.1 V/s scan rate. 0.1 M $\text{Bu}_4\text{NPF}_6/\text{DMSO}$, supporting electrolyte; E_W , vitreous carbon (ϕ 7.1 mm^2); E_A , Pt° and E_R , non-aqueous Ag/AgCl .

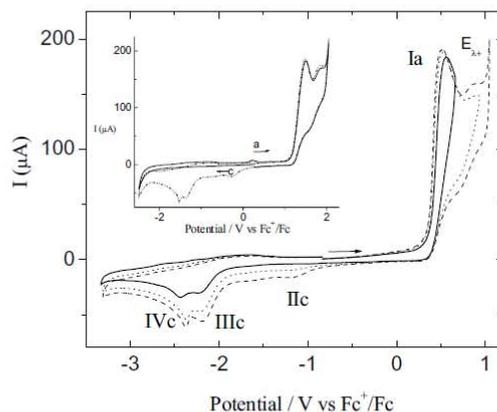
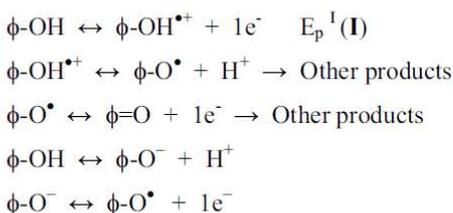


Figure 3. Typical cyclic voltammograms for 2,4,6-trimethyl-phenol 7.4 mM, obtained at different anodic switching potential, $E_{\lambda+}$, to demonstrate the correspondence between the **Ia** oxidation and **IIc**, **IIIc** and **IVc** reduction signals (Inset voltammograms obtained in cathodic (c) and anodic (a) direction starting from OCP). A 0.1 M $\text{Bu}_4\text{NPF}_6/\text{DMSO}$ was used as supporting electrolyte; E_W , vitreous carbon (ϕ 7.1 mm^2); E_A , Pt° and E_R , non-aqueous Ag/AgCl .

The results in this study suggest that **IIIc** and **IVc** signals could be associated with oxidation **Ia**. While **IIc** signal is attributed to oxidation products formed at electrode surface (above 0.65 V/ Fc^+/Fc) according with the literature (20, 21). The reaction

mechanism that describes the process is represented below, where ϕ refers to phenyl group:



Cyclic voltammograms at variable scan rate have not been performed because these phenolic compounds showed an irreversible behavior, so, only peak potential (E_p) was measured for all phenols, as a characteristic parameter from oxidation. The E_p values are presented in table IV.

TABLE IV. Measured phenolic oxidation peak potential values in V vs Fc^+/Fc

Compound	E_p^{Ia} (V)	E_p^{IIIc} (V)	E_p^{IVc} (V)
9 2,6-di-tertbutyl-4-methyl-phenol	0.827	-1.703	-2.117
7 2-tert-butyl-4-methyl-phenol	0.827	-1.184	-2.155
6 2-isopropyl-5-methyl-phenol	0.811	-0.856	-2.198
8 2,4,6-trimethyl-phenol	0.647	-2.214	-2.363

The main phenolic oxidation peak, E_p^{Ia} , has similar value except for compound **8**. This difference could be attributed to a less steric hydrance for the species **8** and his oxidation product stabilization. Apparently, voluminous substituents as $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ and $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ modified more significantly the first reduction potential for the previously oxidized product in **Ia** (see table IV).

According with previous observations, naphtoquinones that showed the largest difference in peak potential are **2** ($E_{1/2}^{\text{I}} = -1.296$ V and $E_{1/2}^{\text{II}} = -1.955$ V) and **4** ($E_{1/2}^{\text{I}} = -0.842$ V and $E_{1/2}^{\text{II}} = -1.453$). Study for phenolic derivatives showed that compounds **6**, **7** and **9** have similar oxidation potential ($E_p^{\text{Ia}} \sim -0.82$ V) and **8** has the smallest positive value ($E_p^{\text{Ia}} = -0.647$ V). Then, compounds **2**, **4**, **6** and **8** will be considered to evaluate their properties towards the BK channel in electrophysiological studies. At this moment, just the interaction of compound **6** on BK channel has been performed.

Electrophysiological assays.

The 2-isopropyl-5-methyl-phenol, compound **6**, was selected to assay its activity on BK currents. Uninjected oocytes (negative control) elicited very small endogenous currents (data not shown); those are background responses to repetitive pulses. Water-injected oocytes (no BK channels) currents are used as control under whole cell recording (Figure 4a) and they are also similar in magnitude compared with uninjected oocytes (negative control). Addition of EtOH or compound **6** (6.5 mM) did not modify endogenous currents (Figures 4b and 4c, respectively). Figure 4d shows striking outward BK currents only at 80, 60, 40 and 20 mV pulses (Figure 4d *i-iv*). No obvious current modification is observed after addition of EtOH (Figure 4e). Finally when compound **6**

was added, BK currents showed an increase (Figure 4f) and a different pattern from 80 to 40 mV (Figure 4f *i-iii*); these changes were bigger at more depolarized potential values. The BK channel modification for the opening mechanism could explain the temporal current increase at 80 mV (Figure 4f *i*). This result confirms the thymol interaction (activation) with BK channels. However, it is necessary to elucidate if this activation occurred by a direct or indirect way.

In our knowledge, the activator effect of 2-isopropyl-5-methyl-phenol is not reported for BK channel heterologously expressed in *Xenopus* oocytes. The electrochemical assays disclose that BK channel modulation, by activators or inhibitors such as phenolic or naphthoquinone derivatives, should be modified by changes of redox potential.

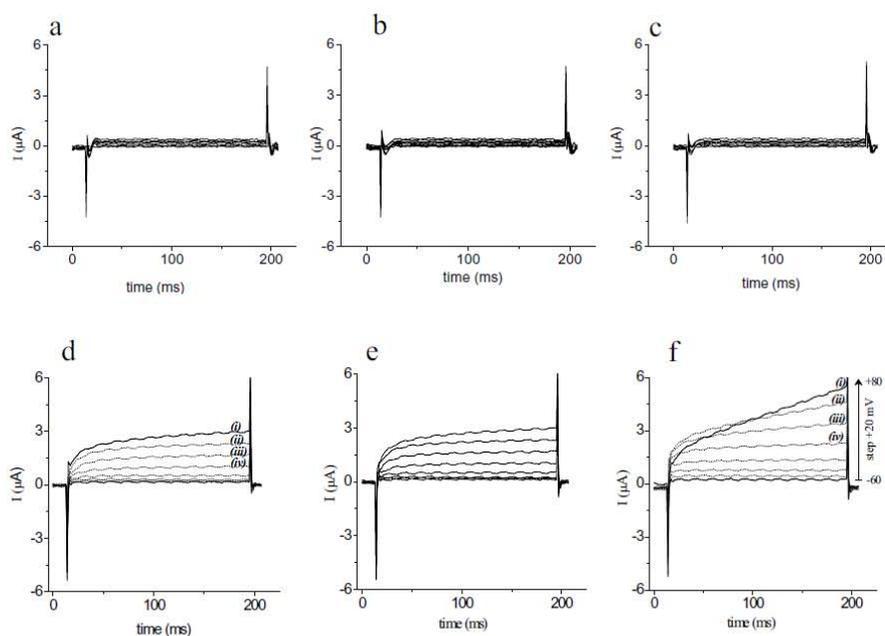


Figure 4. Activity of compound 2-isopropyl-5-methyl-phenol on BK channels. Potassium currents were recorded under whole cell configuration using two-electrode voltage clamp in ND96 solution. Control currents show in absence (a) and (d), in presence of EtOH (b) and (e), and finally endogenous and BK currents with 6.5 mM of **6** (c) and (f). Currents were elicited by depolarizing the membrane for 190 ms, from a holding potential of -60 mV to $+80$ in 20 mV steps, $+80$ (i), $+60$ (ii), $+40$ (iii), $+20$ (iv) mV. Pulse protocol was applied at maximum rate.

Conclusions

In this work has being observed redox potential differences depending on the substituent nature from 1,4-naphthoquinone and phenolic derivatives. For the first ones, the differences are attributed to electrodonor and electroattractor effects of substituents. By another hand, in phenolic compounds oxidation, apparently the first reduction potential

for the products formed on electrode surface is more sensitive to voluminous groups. The 1,4-naphthoquinones and phenolic derivatives studied could be used as inhibitor or activators on BK channels. Our results demonstrated for the first time that 2-isopropyl-5-methyl-phenol (thymol) has an activator effect on BK channel heterologously expressed in *Xenopus* oocytes.

Acknowledgements

Partial financial supports by CONACyT (through a scholarship for TRF) and by PAPIIT-DGAPA-UNAM (Projects IN 208305 and IN 215508) are gratefully acknowledged.

References

1. F. M. Ascroft, *Ion Channel and Diseases*, Academic Press, p. 97-124 San Diego (2000).
2. P. Meera, M. Wallner, M. Song and L. Toro, *Neurobiol.*, **94**, 14066 (1997).
3. R. M. Martínez, *Archiv. Cardiol.*, **74**, S205 (2004).
4. M. H. Huang, S. N. Wu and A. Y. Shen, *Planta Med.*, **71**, 1093 (2005).
5. W. Lin, S. R. Yang, M. H. Huang and S. N. Wu, *J. Biol. Chem.*, **279**, 26885 (2004).
6. O. B. McManus, G. H. Harris, K. M. Giangiacomo, P. Feigenbaum, J. P. Reuben, M. E. Addy, J. F. Burka, G. J. Kaczorowski and M. L. Garcia, *Biochem.*, **32**, 6128 (1993).
7. Y. J. Wang, Y. C. Liu, H. D. Chang and S. N. Wu, *Planta Med.*, **72**, 430 (2006).
8. M. H. Huang, S. N. Wu and A. Y. Shen, *Life Sci.*, **70**, 1185 (2002).
9. D. B. Raoof and S. M. Golabi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **68**, 2253 (1995).
10. N. Gupta and H. Linschitz, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 6384 (1997).
11. D. Pletcher and H. Thompson, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **94**, 3445 (1998).
12. M. Aguilar-Martínez, J. A. Bautista-Martínez, N. Macías-Ruvalcaba, I. González, E. Tovar, T. Marín del Alizal, O. Collera and G. Cuevas, *J. Org. Chem.*, **66**, 8349 (2001).
13. M. Aguilar-Martínez, N. Macías-Ruvalcaba, J. A. Bautista-Martínez, M. Gómez, F. J. González and I. González, *Curr. Org. Chem.*, **8**, 1721 (2004).
14. J. A. Bautista-Martínez, I. González and M. Aguilar-Martínez, *J. Electroanal. Chem.*, **573**, 289 (2004).
15. M. Gómez, F. J. González and I. González, *J. Electroanal. Chem.*, **578**, 193 (2005).
16. G. Gritzner and J. Küta, *Pure Appl. Chem.*, **4**, 461 (1984).
17. J. García-Valdés, F. Z. Zamudio, L. Toro and L. D. Possani, *FEBS Lett.*, **505**, 369 (2001).
18. R. S. Nicholson and I. Shain, *Anal. Chem.*, **36**, 706 (1964).
19. C. Frontana, A. Vázquez-Mayagoitia, J. Garza, R. Vargas and I. Gonzalez, *J. Phys. Chem. A*, **110**, 9411 (2006).
20. H. Lund and O. Hammerich, *Organic Electrochemistry*, pp. 589-599 Marcel & Decker, New York (2001).
21. S. Michalkiewicz, M. Mechanik and J. Malyszko, *Electroanal.*, **16**, 588 (2004).

1. Terlau, H; Stühmer, W. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Naturwiss.* 85 (1998) 437-444.
2. Hille, B. Ionic channels of excitable membranes (1992) Sinauer Associates, Sunderland Massachusetts.
3. Alberts B.; Bray D.; Lewis J.; Raff M.; Roberts K.; Watson J. (2002) Molecular biology of the cell, Garland Science, New York.
4. Sperelakis, N. (1998) Cell physiology, Academic Press, San Diego, California.
5. Jan, L.; Jan, N. Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annu. Rev. Neurosci.* 20 (1997) 91–123.
6. Cattalini, W. Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology. *Neuron* 67 (2010) 915-928.
7. Doyle, D.; Cabral, J.; Pfuetzner, R.; Kuo, A.; Gulbis, J.; Cohen, S.; Chait, B.; MacKinnon, R. The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science.* 280 (1998) 69-77.
8. Miller, C. An overview of the potassium channel family. *Genome Biol.* 1 (2000) Rev 4.1- 4.5.
9. Miller, C. Ion channels: doing hard chemistry with hard ions. *Curr. Opin. Chem. Bio.* 4 (2000) 148-151.
10. Ashcroft, F. Ion channels and disease. (2000) Academic Press, San Diego, California.
11. Gutman, G.; Chandy, K.; Grissmer, S.; Lazdunski, M. MacKinnon, D; Pardo, L.; Robertson, G.; Rudy, B.; Sanguinetti, M.; Stühmer, W.; Wang, X. International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev.* 57 (2005) 473-508.
12. Yellen, G.; Keeping K⁺ completely comfortable. *Nat. Struct. Biol.* 8 (2001)1011-1013.
13. MacKinnon, R.; Miller, C.; Mutant potassium channels with altered binding of charybdotoxin, a pore-blocking peptide inhibitor. *Science* 245 (1989) 1382-1385.
14. Li-Smering, Y.; Hackos, D.; Swartz, K. A localized interaction surface for voltage-sensing domains on the pore domain of a K⁺ channel. *Neuron* 25 (2000) 411-423.
15. Shieh, C.; Coghlan, M.; Sullivan, J.; Gopalakrishnan, M. Potassium channels: Molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharm. Rev.* 52 (2000) 557-593.
16. Wang, J.; Xiang, M. Targeting potassium channels Kv1.3 and KCa3.1: Routes to selective immunomodulators in autoimmune disorder treatment? *Pharmacotherapy* 33 (2013) 515-528.
17. Chen, R.; Chung, S. Engineering a potent and specific blocker of voltage-gated potassium channel Kv1.3, a target for autoimmune diseases. *Biochem.* 51 (2012) 1976–1982.
18. Rangaraju, S.; Chi, V.; Pennington, M. Kv1.3 potassium channels as a therapeutic target in multiple sclerosis. *Expert Opin Ther Targets.* 13 (2009) 909-924.
19. Rus, H.; Pardo, C.; Hu, L.; Darrah, E.; Cudrici, C.; Niculescu, T.; Niculescu, F.; Mullen, K.; Allie, R.; Guo, L.; Wulff, H.; Beeton, C.; Judge, S.; Kerr, D.; Knaus, H.; Chandy, K.; Calabresi, P. The voltage-gated potassium channel Kv1.3 is highly expressed on inflammatory infiltrates in multiple sclerosis brain. *Proc Natl Acad Sci.* 102 (2005) 11094-11099.
20. Choi, B.; Hahn, S. Kv1.3: a potential pharmacological target for diabetes. *Acta Pharmacol Sin.* 31 (2010) 1031-1035.
21. Toldi, G.; Vásárhelyi, B.; Kaposi, A.; Mészáros, G.; Pánczél, P.; Hosszúfalusi, N.; Tulassay, T.; Treszl, A. Lymphocyte activation in type 1 diabetes mellitus: The increased significance of Kv1.3 potassium channels. *Immunology Letters* 133 (2010) 35-41.
22. Gilhar, A.; Keren, A.; Shemer, A.; Ullmann, Y.; Paus, R. Blocking potassium channels (Kv1.3): A new treatment option for alopecia areata? *Journal of Investigative Dermatology* 133 (2013) 2088–2091.
23. Nguyen, W.; Howard, B.; Neale, D.; Thompson, P.; White, P.; Wulff, H.; Manallack, D. Use of Kv1.3 blockers for inflammatory skin conditions. *Curr Med Chem.* 17 (2010) 2882–2896.
24. Toldi, G.; Bajnok, A.; Dobi, D.; Kaposi, A.; Kovács, L.; Vásárhelyi, B.; Balog, A. The effects of Kv1.3 and IKCa1 potassium channel inhibition on calcium influx of human peripheral T lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Immunobiology* 218 (2013) 311-316.
25. Chen, J.; Avdonin, V.; Ciorba, M.; Heinemann, S.; Hoshi, T. Acceleration of P/C-type inactivation in voltage-gated K1 channels by methionine oxidation. *Biophys. J.* 78 (2000) 174–187.
26. Ciorba, M.; Heinemann, S.; Weissbach, H.; Brot, N.; Hoshi, T. Regulation of voltage-dependent K channels by methionine oxidation: effect of nitric oxide and vitamin C. *FEBS Lett.* 442 (1999) 48-52.
27. MacKinnon, R.; Heginbotham, L.; Abramson, T. Mapping the receptor site for charybdotoxin, a pore-blocking potassium channel inhibitor. *Neuron* 5 (1990) 767-771.

28. Abbas, N.; Belghazi, M.; Mottaleb, Y.; Tytgat, J.; Bougis, P.; Martin-Eauclaire, M. A new kaliotoxin selective towards Kv1.3 and Kv1.2 but not Kv1.1 channels expressed in oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 376 (2008) 525-530.
29. Aiyar, J.; Withka, J.; Rizzi, J.; Singleton, D.; Andrews, G.; Lin, W.; Boyd, J.; Hanson, D.; Simon, M.; Dethlefs, B.; Lee, C.; Hall, J.; Gutman, G.; Chandy, K. Topology of the pore-region of a K⁺ channel revealed by the NMR-derived structures of Scorpion Toxins. *Neuron* 15 (1995) 1169-1181.
30. Wang, X.; Liao, Y.; Zou, A.; Li, L.; Tu, D. Blockade action of ketanserin and increasing effect of potassium ion on Kv1.3 channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Pharm. Res.* 56 (2007) 148-154.
31. Rauer, H.; Grissmer, S. The effect of deep pore mutations on the action of phenylalkylamines on the Kv1.3 potassium channel. *British. J. Pharm.* 127 (1999) 1065-1074.
32. Molina, A.; Castellano, A.; Lopez-Barneo, J. Pore mutations in Shaker K⁺ channels distinguish between the sites of tetraethylammonium blockade and C-type inactivation. *J. Physiol.* 499 (1997) 361-367.
33. Yeola, S.; Rich, T.; Uebele, V.; Tamkun, M.; Snyder, D. Molecular analysis of a binding site for quinidine in human cardiac delayer rectifier K⁺ channel. *Circ. Res.* 78 (1996) 1105-1114.
34. Yellen, G.; Sodickson, D.; Chen, T.; Jurman, M. An engineered cysteine in the external mouth of a K⁺ channel allows inactivation to be modulated by metal binding. *Biophysical Journal* 66 (1994) 1068-1075.
35. Schulteis, C.; John, S.; Huang, Y.; Tang, C.; Papazian, D. Conserved cysteine residue in the Shaker K⁺ channel is not linked by disulphide bond. *Biochem* 34 (1995) 1725-1733.
36. Schulteis, C.; Nagoya, N.; Papazian, D. Intersubunit interaction between amino- and carboxyl-terminal cysteine residues in tetrameric Shaker K⁺ channels. *Biochem* 35 (1996) 12133-12140.
37. Bartlett P. Bioelectrochemistry. Fundamentals, experimental techniques and applications. (2008) John Wiley & sons, Wiltshire, England.
38. Halliwell J.; Plant T.; Robbins J.; Standen N. Voltage clamp techniques. Microelectrodes techniques. (1994) The company of Biologists, Cambridge, 17-35.
39. Stuhmer, W. Electrophysiologic recordings from *Xenopus* oocytes. *Meth. in Enzymol.* 293 (1998) 280-300.
40. Stuhmer, W. Electrophysiological recordings from *Xenopus* oocytes. *Meth. in Enzymol.* 207 (1992) 319-339.
41. Gurdon J.; Lane, C.; Woodland, H.; Mairbaix, G. Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 233 (1971) 177-182.
42. Weber, M. Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochim Biophys Acta.* 1421 (1999) 213-233.
43. Krogmann, D.; Olivero, E. The specificity of plastoquinone as a cofactor for photophosphorylation. *J. Biol. Chem.* 237 (1962) 3292-3295.
44. Navas, P.; Villalba, J.; Cabo, R. The importance of plasma membrane coenzyme Q in aging and stress response. *Mitochondrion*, 7S (2007) S34-S40.
45. Card, D.; Gorska, R.; Cutler J.; Harrington D. Vitamin K metabolism: Current knowledge and future research. *Mol. Nutr. Food Res.* (2013) 1-11.
46. [Sun, C.](#); [Dou, S.](#); [Du, J.](#); [Yang, X.](#); [Li, Y.](#); [Wang, J.](#) Doxorubicin conjugate of poly(ethylene glycol)-block-polyphosphoester for cancer therapy. *Adv Health. Mater.* (2013).
47. [Cambón, A.](#); [Rey-Rico, A.](#); [Mistry, D.](#); [Brea, J.](#); [Loza, M.](#); [Attwood, D.](#); [Barbosa, S.](#); [Alvarez-Lorenzo, C.](#); [Concheiro, A.](#); [Taboada, P.](#); [Mosquera, V.](#) Doxorubicin-loaded micelles of reverse poly(butylene oxide)-poly(ethylene oxide)-poly(butylene oxide) block copolymers as efficient "active" chemotherapeutic agents. *Int J Pharm.* 10 (2013) 47-57.
48. [Choi, R.](#); [Ngoc, T.](#); [Bae, K.](#); [Cho, H.](#); [Kim, D.](#); [Chun, J.](#); [Khan, S.](#); [Kim, Y.](#) Anti-inflammatory properties of anthraquinones and their relationship with the regulation of P-glycoprotein function and expression. *Eur J Pharm Sci.* 23 (2013) 272-281.
49. Bachur, N.; Gordon, S.; Gee, M. A general mechanism for microsomal activation of quinone anticancer agents to free radicals. *Cancer Res.* 38 (1978) 1745-1750.
50. Goulart, M.; Zani, C.; Tonholo, J.; Freitas, L.; de Abreu, F.; Oliveira, A.; Raslan, D.; Starling, S.; Chiari, E. Trypanocidal activity and redox potential of heterocyclic and 2-hydroxy-naphthoquinones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (1997) 7, 2043-2048.
51. Shen, C.; Syu, W.; Li, S.; Li, Ch.; Lee, G.; Sun, Ch. Antimicrobial activities of naphthazarins from *Arnebia euchrona*. *J Nat. Prod.* 65 (2002) 1857-1862.

52. Meazza, G.; Dayan, F.; Wedge, D. Activity of quinones on *Colletotrichum* species. *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 3824-3828.
53. Fisher, A.; Labenski, M.; Malladi, V.; Gokhale, M.; Bowen, R.; Milleron, S.; Bratton, T.; Monks, S.; Lau, S. Quinone electrophiles selectively adduct "Electrophile binding motifs" within cytochrome c. *Biochem.* 47 (2007) 11090-110100.
54. Shechter, Y. Selective oxidation and reduction of methionine residues in peptides and proteins by oxygen exchange between sulfoxide and sulfide. *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 66-70.
55. Evanst, M.; Pryor, W.; Damage to human a-l-proteinase inhibitor by aqueous cigarette tar extracts and the formation of methionine sulfoxide. *Chem. Res. Toxicol.* 5 (1992) 654-660.
56. Schulteis, C.; John, S.; Huang, Y.; Tang, C.; Papazian, D. Conserved cysteine residue in the Shaker K⁺ channel is not linked by disulphide bond. *Biochem.* 34 (1995) 1725-1733.
57. Brot, N.; Weissbach, H. Biochemistry and physiological role of methionine sulfoxide residues in proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 223 (1983) 271-281.
58. Melin, F.; Hellwing, P. Recent advances in the electrochemistry and spectroelectrochemistry of membrane proteins. *Biol. Chem.* 394 (2013)593-609.
59. [Jacob, R.](#); [Aleo, M.](#); [Self-Medlin, Y.](#); [Doshna, C.](#); [Mason, R.](#) 1,2-naphthoquinone stimulates lipid peroxidation and cholesterol domain formation in model membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1 (2013) 7189-7197.
60. [Baghiani, A.](#); [Charef, N.](#); [Djarmouni, M.](#); [Saadeh, H.](#); [Arrar, L.](#); [Mubarak, M.](#) Free radical scavenging and antioxidant effects of some anthraquinone derivatives. *Med Chem.* 6 (2011) 639-644.
61. [Miura, T.](#); [Shinkai, Y.](#); [Hirose, R.](#); [Iwamoto, N.](#); [Cho, A.](#); [Kumagai, Y.](#) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a quinone reductase in the suppression of 1,2-naphthoquinone protein adduct formation. *Free Radic Biol Med.* 51 (2011) 2082-2089.
62. Rodriguez, C.; Fukuto, J.; Taguchi, K.; Froines, J.; Cho, A. The interactions of 9,10-phenanthrenequinone with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), a potential site for toxic actions. *Chemico-Biological Interactions* 155 (2005) 97-110.
63. Thorna, C.; Oshiroa, C.; Marshe, S.; Hernandez-Boussard, T.; McLeodd, H.; Kleina, T.; Altmana, R. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics* 21 (2011) 440-446.
64. Constantini, P.; Boris, V.; Petronilli, V.; Bernardi, P. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites. *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 6746-6751.
65. Palmeira, C.; Wallace, K. Benzoquinone inhibits the voltage-dependent induction of the mitochondrial permeability transition caused by redox-cycling naphthoquinones. *Tox. Appl. Pharm.* 143 (1997) 338-347.
66. Feng, W.; Liu, G.; Xia, R.; Abramson, J.; Pessah, I. Site-selective modification of hyperreactive cysteines of ryanodine receptor complex by quinones. *Mol. Pharma.* 55 (1999) 821.
67. Huang, M.; Wu, S.; Shen, A. Inhibition of Ca²⁺-activated and voltage-dependent K⁺ currents by 2-mercaptophenyl-1,4-naphthoquinone in pituitary GH3 cells. Contribution to its antiproliferative effect. *Life Sci.* 70 (2002) 1185-1203.
68. Wang, Y.; Liu, Y.; Chang, H.; Wu, S. Diosgenin, a plant-derived sapogenin, stimulates Ca²⁺-activated K⁺ current in human cortical HCN-1A neuronal cells *Planta Med.* 72 (2006) 430-436.
69. Lin, M.; Yang, S.; Huang, M.; Wu, S. Stimulatory actions of caffeic acid phenethyl ester, a known inhibitor of NF- κ B activation, on Ca²⁺-activated K⁺ current in pituitary GH3 cells. *J of Biol. Chem.* 279 (2004) 26885-26992.
70. McManus, O.; Harris, G.; Giangiacomo, K.; Feigenbaum, P.; Reuben, J.; Addy M.; Burka, J.; Kaczorowski, G.; Garcia, M. An activator of calcium-dependent potassium channels isolated from a medicinal herb. *Biochem.* 32 (1993) 6128-6133.
71. Hasan, S.; Yamashita, E.; Baniulis, D.; Cramer, A. Quinone-dependent proton transfer pathways in the photosynthetic cytochrome b₆f complex. *PNAS* 110 (2013) 4297-4302.
72. Murai, M.; Matsunobu, K.; Kudo, S.; Ifuku, K.; Kawamukai, M.; Miyoshi, H. Identification of the binding site of the quinone-head group in mitochondrial Coq10 by photoaffinity labeling. *Biochem.* 53 (2014) 3995-4003.

73. Satheshkumar, A.; Elango, K. Spectroscopic and molecular docking studies on the charge transfer complex of bovine serum albumin with quinone in aqueous medium and its influence on the ligand binding property of the protein. *Spectrochimica Acta A* 130 (2014) 337-343.
74. Gritzner, G.; Küta, J. Physical and biophysical chemistry division commission on electrochemistry. *Pure Appl. Chem.* 4 (1984) 461-466.
75. Stühmer, W.; Ruppersberg, J.; Schröter, K.; Sakmann, B.; Stocker, M.; Giese, K.; Perschke, A.; Baumann, A.; Pongs, O. Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian. *EMBO J.* 8 (1989) 3235-3244.
76. Hoshi, T.; Zagotta, W.; Aldrich, W.; Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* 250 (1990) 533-538.
77. Zagotta, W.; Hoshi, T.; Aldrich, W. Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science* 250 (1990) 568-571.
78. Shih, T.; Smith, R.; Toro, L.; Goldin, A. High-level expression and detection of ion channels in *Xenopus* oocytes. *Meth. in Enzymol.* 293 (1998) 529-556.
79. Grissmer, S.; Ghanshani, S.; Dethlefs, B.; McPherson, J.; Wasmuth, J.; Gutman, G.; Cahalan, M.; Chandy, K. The Shaw-related potassium-channel gene, Kv3.1, on human chromosome 11, Encodes the type I K⁺ channel in T cells. *Journal of Biological Chemistry* 267 (1992):20971-20979.
80. a) Arnold, K.; Bordoli, L.; Kopp, J.; Schwede, T. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22 (2006) 195-201. b) Schwede, T.; Kopp, J.; Guex, N.; Peitsch, M. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research* 31 (2003) 3381-3385. c) Guex, N.; Peitsch, M. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* 18 (1997) 2714-2723.
81. a) Schneidman-Duhovny, D.; Inbar, Y.; Nussinov, R.; Wolfson, H. PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. *NAR* 33 (2005) W363-W367. b) Schneidman-Duhovny, D.; Inbar, Y.; Nussinov, R.; Wolfson, H. Geometry based flexible and symmetric protein docking. *Proteins* 60 (2005) 224-231.
82. Solorio-Alvarado, C.; Peña-Cabrera, E.; García-Soto, J.; López-Godínez, J.; González, F.; Álvarez-Hernández, A. 2-Hydroxynaphthoquinones. Synthesis, electrochemical study, and biological assays of activity. *ARKIVOC* (2009) 239-257.
83. Wang, L.; Zhang, Z.; Ye, B. Study on the electrochemical behaviour of the anticancer herbal drug emodin. *Electrochimica Acta* 51 (2006) 5961-5965.
84. Gupta, N.; Linschitz, H. Hydrogen-bonding and protonation effects in electrochemistry of quinones in aprotic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 6384-6391.
85. Pletcher, D.; Thompson, H. A microelectrode study of the influence of electrolyte on the reduction of quinones in aprotic solvents. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 94 (1998) 3445-3450.
86. Bautista-Martínez, J.; González, I.; Aguilar-Martínez, M. Correlation of voltammetric behavior of α -hydroxy and α -methoxy quinones with the change of acidity level in acetonitrile. *J. Electroanal. Chem.* 573 (2004) 289-298.
87. Aguilar-Martínez, M.; Macías-Ruvalcaba, N.; Bautista-Martínez, J.; Gómez, M.; González, F.; González, I. Review: Hydrogen bond and protonation as modifying factors of the quinone reactivity. *Current. Org. Chem.* 8 (2004) 1721-1738.
88. Aguilar-Martínez, M.; Bautista-Martínez, J.; Macías-Ruvalcaba, N.; González, I.; Tovar, E.; Marín del Alizal, T.; Collera, O.; Cuevas, G. Molecular structure of substituted phenylamine α -OMe- and α -OH-p-benzoquinone derivatives. *J. Org. Chem.* 66 (2001) 8349-8363.
89. Gómez, M.; González, F.; González, I. Intra and intermolecular hydrogen bonding effects in the electrochemical reduction of α -phenolic-naphthoquinones. *J. Electroanal. Chem.* 578 (2005) 193-202.
90. Inbaraj, J.; Chignell, C. Cytotoxic action of juglone and plumbagin: A mechanistic study using HaCaT keratinocytes. *Chem. Res. Toxicol.* 17 (2004) 55-62.
91. Hernández-Muñoz, L.; Gómez, M.; González, F.; González, I.; Frontana, C. Towards a molecular-level understanding of the reactivity differences for radical anions of juglone and plumbagin: an electrochemical and spectroelectrochemical approach. *Org. Biomol. Chem.* 7 (2009) 1896-1903.
92. D. B. Raoof, S. M. Golabi, Electrochemical properties of carbon-paste electrodes spiked with some 1,4-naphthoquinone derivatives. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 68 (1995) 2253-2261.
93. G. Mabbott, An introduction to cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education* 60 (1983) 697-701.

94. J. M Pingarrón , P. Sanchez, Química Electroanalítica (1999) Ed. Síntesis, España.
95. J. Bard, L. R. Faulkner, Electrochemical methods, fundamental and application (1980) John Wiley & Sons, New York.
96. C. Frontana, B.A. Frontana-Uribe, I. González, Electrochemical study of 7 α ,12,20-o-trimethylconacytone. *Electrochimica Acta* 48 (2003) 3593–3598.
97. P. Guin, S. Das, P. Mandal, Electrochemical reduction of quinones in different media: A review. *Int. J. Electrochem.* (2011).
98. M. Pham; B. Piro; E. Bzzaoui; M. Hedayatullah; J. Lacroix; P. Novák; O., Haas. Anodic oxidation of 5-amino-1,4-naphthoquinone (ANQ) and synthesis of a conducting polymer (PANQ). *Synthetic Metals* 92 (1998) 197-205.
99. H. Lund; O. Hammerich. *Organic Electrochemistry* (2001). Marcel Dekker, Inc., Basel New York.
100. G. Mabbott. An introduction to cyclic voltammetry. *J. Chem Edu.* 60 (1983) 697-701.
101. P. Kissinger; W. Heineman. Cyclic voltammetry. *J. Chem. Edu.* 60 (1983) 702-706.
102. F. González, Cyclic voltammetry of two analogue K-group vitamin compounds in dimethylsulfoxide. *Electroanalysis.* 10 (1998) 638–642.
103. M. Gómez, F. González, I. González. Intra and intermolecular hydrogen bonding effects in the electrochemical reduction of α -phenolic-naphthoquinones. *J. Electroanal. Chem.* 578 (2005) 193-202.
104. C. Frontana, I. Gonzalez. The role of intramolecular Hydrogen Bonding in the Electrochemical Behaviour of Hydroxy-Quinones and in Semiquinones Stability. *J. Braz. Chem. Soc.* 16 (2005) 299-307.
105. N. Macías-Ruvalcaba; D. Evans. Association reactions of the anion radicals of some hydroxyquinones: Evidence for formation of π - and σ -dimers as well as a neutral-anion radical complex. *J. Phys. Chem. C* 114 (2010) 1285-1292.
106. N. Macías-Ruvalcaba; G. Fenton; D. Evans. Contrasting behaviour in the reduction of 1,2-acenaphthylenedione and 1,2-aceanthrylenedione. Two types of reversible dimerization of anion radicals. *J. Phys. Chem. C* 113 (2009) 338-345.
107. N. Macías-Ruvalcaba; N. Okumura; D. Evans. Change in reaction pathway in the reduction of 3,5-di-tert-butyl-1,2-benzoquinone with increasing concentration of 2,2,2-trifluoroethanol. *J. Phys. Chem. B*, 2001, 105 (37), 8877–8884.
108. L. Hernández-Muñoz; M. Gómez; F. González; I. González; C. Frontana. Towards a molecular-level understanding of the reactivity differences for radical anions of juglone and plumbagin: an electrochemical and spectroelectrochemical approach. *Organic & Biomolecular Chemistry* 7 (2009) 1896-1903.
109. B. Eggins, J. Chambers, Proton effects in the electrochemistry of the quinone hydroquinone system in aprotic solvents. *J. Electrochem. Soc.* 117 (1970) 186–192.
110. M. Gómez, F. González, I. González, A model for characterization of successive hydrogen bonding interactions with electrochemically generated charged species. The quinone electroreduction in the presence of donor protons. *Electroanalysis* 15 (2003) 635–645.
111. M. Aguilar-Martínez, N. Macías-Ruvalcaba, J. Bautista-Martínez, M. Gómez, F. González, I. González. Review: Hydrogen Bond and Protonation as Modifying Factors of the Quinone Reactivity. *Curr. Org. Chem.* 8 (2004) 1721-1738.
112. P. Astudillo, J. Tiburcio, F. González, The role of acids and bases on the electrochemical oxidation of hydroquinone: Hydrogen bonding interactions in acetonitrile. *J. Electroanal. Chem.* 604 (2007) 57–64.
113. P. J. Thornalley, A. Stern; The hydrolytic autoxidation of 1,4-naphthoquinone-2-potassium sulphonate: implications for 1,4-naphthoquinone-2-potassium sulphonate-induced oxidative stress in the red blood cell. *Chem. Biol. Interact* 17 (1985) 55-71.
114. Y. Hui, E. Khim, C. Lin, H. Poh, R. Webster. Hydrogen-bonding interactions between water and the one and two-electron-reduced forms of vitamin K1: applying quinone electrochemistry to determine the moisture content of non-aqueous solvents. *JACS* 131 (2009) 1523-1534.
115. J. E. Heffner, C. T. Wigal, O. A. Moe, Solvent dependence of the one-electron reduction of substituted benzo- and naphthoquinones. *Electroanalysis* 9 (1997) 629–632.
116. C. Frontana, A. Vázquez-Mayagoitia, J. Garza, R. Vargas, I. González, Substituent effect on a family of quinones in aprotic solvents: An experimental and theoretical approach. *J. Phys. Chem. A* 110 (2006) 9411–9419.

117. M. Quan, D. Sanchez, M. Wasylkiw, D. Smith. Voltammetry of quinones in unbuffered aqueous solution: reassessing the roles of proton transfer and hydrogen bonding in the aqueous electrochemistry of quinones. *JACS* 129 (2007) 12847-12856.
118. P. Guin, S. Das, P. Mandal. Electrochemical reduction of quinones in different media: a review. *Int. J. Electrochem.* 2011 (2011) 1-22.
119. Salas, M.; Gómez, M.; González, F.; Gordillo, B. Electrochemical reduction of 1,4-benzoquinone. Interaction with alkylated thymine and adenine nucleobases. *J. Electroanal. Chem.* 543 (2003) 73-81.
120. Aidley, D. J.; Stanfield, P. R. *Ion Channel Molecules in Action* (1996) Cambridge, University Press, New York, 1996.
121. L. Tu, A. Helm, W. Skach, C. Deutsch, Transmembrane Biogenesis of Kv1.3. *Biochem.* 39 (2000) 824-836.
122. L.I. Escobar, J.C. Martínez-Téllez, M. Salas, S. A. Castilla, R. Carrisoza, D. Tapia, M. Vázquez, J. Bargas, J. J. Bolívar. A voltaje-gated K(+) current in renal inner medullary collecting duct cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 286 (2004) 965-974.
123. Dopico, A. Ethanol sensitivity of BKCa channels from arterial smooth muscle does not require the presence of the β 1-subunit. *Am J Physiol Cell Physiol* 284 (2003) C1468-C1480.
124. Covarrubias, M.; Vyas, B.; Escobar, L.; Wei, A. Alcohols inhibit a cloned potassium channel at a discrete saturable site. *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 19408-19416.
125. Dopico, A.; Anantharam, V.; Treistman, S. Ethanol increases the activity of Ca⁺⁺-dependent K⁺ (*mslo*) channels: Functional interaction with cytosolic Ca⁺⁺. *J. Pharm. Exp. Therapeutics* 284 (1998) 258-268.
126. Salazar, H.; Llorente, I.; Jara-Oseguera, A.; García-Villegas, R.; Munari, M.; Gordon, S.; Islas, L.; Rosenbaum, T. Single N-terminal cysteine in TRPV1 determines activation by pungent compounds from onion and garlic. *Nat. Neurosci* 11 (2008) 255-261.
127. Varga, Z.; Bene, L.; Pieri, C.; Damjanovich, S.; Gáspár, R. The effect of juglone on the membrane potential and whole-cell K⁺ currents of human lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 218 (1996) 828-832.
128. Palmeira, C.; Wallace, K. Benzoquinone inhibits the voltage-dependent induction of the mitochondrial permeability transition caused by redox-cycling naphthoquinones. *Tox. Appl. Pharm.* 143 (1997) 338-347.
129. Kikuno, S.; Taguchi, K.; Iwamoto, N.; Yamanoc, S.; Chod, A.; Froines, J.; Kumagaib, Y. 1,2-Naphthoquinone activates vanilloid receptor 1 through increased protein tyrosine phosphorylation, leading to contraction of guinea pig trachea. *Tox. and Appl. Pharm.* 210 (2006) 47-54.
130. Feng, W.; Liu, G.; Xia, R.; Abramson, J.; Pessah, I. Site-selective modification of hyperreactive cysteines of ryanodine receptor complex by quinones. *Mol. Pharmacol.* 55 (1999) 821-831.
131. Petronilli, V.; Constantini, P.; Scorrano, L.; Colonna, R.; Passamonti, S.; Bernardi, P. The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols. *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 16638-16642.
132. Vogt, W. Oxidation of methionyl residues in proteins; tools, targets and reversal. *Free Rad. Biol. & Med.* 18 (1995) 93-105.
133. Kayashima, T.; Mori, M.; Yoshida, H.; Mizushima, Y.; Matsubara, K.; 1,4-Naphthoquinone is a potent inhibitor of human cancer cell growth and angiogenesis. *Cancer Letters* 278 (2009) 34-40.
134. Schopfer, P.; Heyno, E.; Drepper, F.; Krieger-Liszka, A. Naphthoquinone-dependent generation of superoxide radicals by quinone reductase isolated from the plasma membrane of soybean. *Plant Physiology* 147 (2008) 864-878.
135. Czirjak, G.; Enyedi, P. Task-3 dominates the background potassium conductance in rat adrenal glomerulosa cells. *Mol. Endocrinology* 16 (2002) 621-629.
136. Brunmark, A.; Cadena, E. Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications. *Free Rad. Biol. and Med.* 7 (1989) 435-477.
137. Begleiter, A.; Blair, G. Quinone induces DNA damage and its relationship to antitumor activity in L5178Y lymphoblast. *Cancer Res.* 44 (1984) 78-82.
138. Balog, E.; Lockamy, E.; Thomas, D.; Ferrington, D. Site specific methionine oxidation initiates calmodulin degradation by the 20S proteasome. *Biochem.* 48 (2009) 3005-3016.
139. Shechter, Y. Selective oxidation and reduction of methionine residues in peptides and proteins by oxygen exchange between sulfoxide and sulfide. *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 66-70.

140. Wang, Z.; Nara, M.; Wang, Y.; Kotlikoff, M. Redox regulation of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel in smooth muscle cells. *J. Gen. Physiol.* 110 (1997) 35–44.
141. Hepp, S.; Gerich, F.; Müller, M.; Sulphydryl oxidation reduces hippocampal susceptibility to hypoxia-induced spreading depression by activating BK channel. *J. Neurophysiol.* 94 (2005) 1091–1103.
142. Stühmer, W.; Ruppersberg, J.; Schröter, K.; Sakmann, B.; Stocker, M.; Giese, K.; Perschke, A.; Baumann, A.; Pongs, O. Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian, *EMBO J.* 8 (1989) 3235–3244.
143. Hoshi, T.; Zagotta, W.; Aldrich, R. Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation, *Science* 250 (1990) 533–538.
144. Zagotta, W.; Hoshi, T.; Aldrich, R. Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB, *Science* 250 (1990) 568–571.
145. Laurie, A. T.; Jackson, R. M.; Q-SiteFinder: an Energy-based method for the prediction of protein-ligand sites. *Bioinformatics* 21 (2005), 1908-1916.
146. V. Petronilli, P. Constantini, L. Scorrano, R. Colonna, S. Passamonti, P. Bernardi, The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols. *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 16638-16642.
147. H. Salazar, I. Llorente, A. Jara-Oseguera, R. Garcia-Villegas, M. Munari, S. Gordon, L. Islas, T. Rosenbaum, A single N-terminal cysteine in TRPV1 determines activation by pungent compounds from onion and garlic. *Nature Neurosci.* 11 (2008) 255-261.
148. W. Feng, G. Liu, R. Xia, J. Abramson, I. Pessah, Site-Selective modification of hyperreactive cysteines or ryanodine receptor complex by quinones. *Mol. Pharm.* 55 (1999) 821-831.
149. M. Namazian, C. Yeh Lin, M. L. Coote, Benchmark Calculations of Absolute Reduction Potential of Ferricinium/Ferrocene Couple in Nonaqueous Solutions. *J. Chem. Theory Comput.* 6 (2010), 2721–2725.
150. V. Pavlishchuk, A. Addison. Conversion constants for redox potentials measured versus different reference electrodes in acetonitrile solutions at 25°C. *Inorg. Chimica Acta* 298 (2000) 97–102.
151. G. Gritzner, J. Küta, Physical and biophysical chemistry division commission on electrochemistry. *Pure Appl. Chem.* 4 (1984) 461–466.
152. R. Nicholson, I. Shain. Theory of Stationary Electrode Polarography Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems. *Anal. Chem* 36 (1964) 706-723.
153. Hoja Técnica de Seguridad del Material, www.sigmaaldrich.com
154. K. Defina, C. Ezell, Jr. Acree. Solubility of Ferrocene in Organic Nonelectrolyte Solvents, Comparison of Observed Versus Predicted Values Based upon Mobile Order Theory. *Phys. and Chem. of Liq.* 39 (2001) 699-710.
155. N. Macías-Ruvalcaba; G. Felton; D. Evans. Contrasting behavior in the reduction of 1,2-acenaphthylenedione and 1,2-aceanthrylenedione. Two types of reversible dimerization of anion radicals. *J. Phys. Chem. C* (2009) 113, 338-345.
156. Cazares Figueroa I. Tesis de Licenciatura: “Determinación de la actividad de esteroides: progesterona y alopregnanolona sobre canales iónicos de potasio” (2009) Facultad de Química, UNAM, México.
157. Stühmer, W.; Ruppersberg, J.; Schröter, K.; Sakmann, B.; Stocker, M.; Giese, K.; Perschke, A.; Baumann, A.; Pongs, O. Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian, *EMBO J.* 8 (1989) 3235–3244.
158. Hoshi, T.; Zagotta, W.; Aldrich, R. Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation, *Science* 250 (1990) 533–538. b)Zagotta, W.; Hoshi, T.; Aldrich, R. Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB, *Science* 250 (1990) 568–571.
159. Grissmer S, Ghanshani S, Dethlefs B, McPherson J, Wasmuth JJ, Gutman GA, Cahalan MD, Chandy KG. The Shaw-related Potassium-Channel Gene, Kv3.1, on Human Chromosome 11, Encodes the Type I K⁺ channel in T Cells. *Journal of Biological Chemistry* 267 (1992):20971-20979.
160. a)Long, S.; Campbell, E.; Mackinnon, R. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* 309 (2005) 897-903. b)Long, S.; Tao, X.; Campbell, E.; Mackinnon, R. Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* 450 (2007) 376-382.

161. Chen, X.; Wang, Q.; Ni, F.; Ma, J. Structure of the full-length Shaker potassium channel Kv1.2 by normal-mode-based X-ray crystallographic refinement. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107 (2010) 11352-11357.