



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Identificación de bloqueadores del canal Nav1.7 en venenos de  
animales ponzoñosos mediante patch-clamp automático.

# TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:

DAVID ANTONIO VILLASEÑOR PEÑA

DIRECTOR DE TESIS

GERARDO ALFONSO CORZO BURGUETE  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CUERNAVACA, MORELOS      OCTUBRE 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## Índice

<b>1</b>	<b>Introducción</b>	<b>5</b>
	1.1.- Los canales iónicos	5
	1.2.- Canales de sodio dependientes de voltaje	6
	1.3.- Dolor y nocicepción	7
	1.4.- Canales iónicos y nocicepción	7
	1.5.- El papel de los Nav en la nocicepción	8
	1.6.- Métodos de estudio de los canales iónicos	10
<b>2</b>	<b>Antecedentes</b>	<b>11</b>
	2.1.- Neurotoxinas de animales venenosos implicadas en nocicepción	11
	2.2.- Canales iónicos y neurotoxinas	12
<b>3</b>	<b>Justificación</b>	<b>13</b>
<b>4</b>	<b>Hipótesis</b>	<b>14</b>
<b>5</b>	<b>Objetivo general</b>	<b>14</b>
<b>6</b>	<b>Objetivos particulares</b>	<b>14</b>
<b>7</b>	<b>Metodología</b>	<b>14</b>
	7.1.- Cromatografía en fase reversa de venenos	14
	7.2.- Cuantificación de fracciones	15
	7.3.- Espectrometría de masas y secuenciación N-terminal	15
	7.4.- Digestiones enzimáticas	15
	7.5.- Cultivo de líneas celulares	16
	7.6.- Ensayos electrofisiológicos	16
	7.7.- Alineamiento de secuencias	17
	7.8.- Pruebas estadísticas	17
<b>8</b>	<b>Resultado</b>	<b>17</b>
	8.1.- Separaciones de los venenos mediante cromatografía en fase	17
	8.2.- Estandarización de cosecha del cultivo celular	19
	8.3.- Ensayos electrofisiológicos	20
	8.3.1.- Curvas I-V en presencia de fracción 30 de Css	20
	8.3.2.- Ensayos de Patch-clamp con fracciones de <i>Micrurus laticollaris</i>	24
	8.3.3.- Ensayos con controles positivos, tetrodotoxina y Atx-II	25
	8.4.- Secuenciación de la F30 de Css	28

	<b>8.5.- Estructura primaria de la F3 de <i>M. laticoralis</i></b>	<b>29</b>
	<b>8.6.- Alineamientos</b>	<b>30</b>
<b>9</b>	<b>Discusión</b>	<b>31</b>
<b>10</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>31</b>
<b>11</b>	<b>Perspectivas</b>	<b>32</b>
<b>12</b>	<b>Referencias</b>	<b>32</b>

### **Lista de abreviaturas**

CHO: Chinese hamster ovary

Css: *Centruroides suffusus suffusus*.

F1: Fracción 1.

F2: Fracción 2

F3: Fracción 3

F4: Fracción 4

F30: Fracción 30.

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

I-V: Corriente-voltaje

Mlat: *Micrurus laticollaris*

Na<sub>v</sub>: Canales iónicos de sodio dependientes de voltaje.

TFA: Ácido trifluoroacético

Ttx: Tetrodotoxina

## Resumen

Los canales iónicos son proteínas transmembranales involucradas en el paso de iones a través de la membrana plasmática de las células. Son cruciales para las propiedades eléctricas de las membranas, y participan en varios procesos fisiológicos como homeostasis iónica, contracción muscular, ritmo cardíaco, etc. Dada su importancia para la fisiología humana, se convierten en importantes objetos de estudio, ya sea para conocer sobre su funcionamiento, como también para la búsqueda de nuevos fármacos que ayuden a aliviar enfermedades.

Por lo anterior, dentro de la investigación farmacéutica los canales iónicos son blancos importantes en el proceso de búsqueda de nuevos compuestos activos. Dentro de la gran variedad de procesos en los que intervienen canales iónicos se encuentran aquellos relacionados a la percepción del dolor. Uno de los canales iónicos que ha sido ligado a dicho proceso es la isoforma 1.7 del canal de sodio dependiente de voltaje ( $\text{Na}_v$  1.7).

En este trabajo se proponen protocolos mínimos para realizar ensayos de patch-clamp automático en el  $\text{Na}_v$  1.7 en presencia de fracciones seleccionadas del veneno del alacrán *Centruroides suffusus suffusus* y del veneno de la serpiente de coral *Micrurus laticorallus*. Las fracciones de ambas especies fueron obtenidas mediante cromatografía en fase reversa. Los ensayos de patch-clamp se realizaron utilizando un equipo automático desarrollado por la empresa Nanion Inc. mediante un protocolo donde se definieron las condiciones de cosecha del cultivo celular de células derivadas de ovario de hámster chino (CHO) que expresan el  $\text{Nav}1.7$ . Cinco fracciones, una del veneno del alacrán *Centruroides suffusus suffusus* y cuatro del veneno de la serpiente de coral *Micrurus laticorallus*, fueron analizadas para conocer su efecto hacia el  $\text{Nav}1.7$ . Los ensayos mostraron que la fracción 30, una fracción con actividad hipoglucémica, del veneno del alacrán no afecta la inactivación ni la activación del  $\text{Nav}1.7$ ; por otro lado sólo una de las fracciones del veneno de la serpiente de coral (fracción 3) tuvo un efecto significativo sobre el  $\text{Na}_v$  1.7. Como complemento, tanto la estructura primaria de la fracción 30 del veneno del alacrán *Centruroides suffusus suffusus* como la del veneno de la serpiente de coral *Micrurus laticorallus* fueron elucidadas. La fracción 30 del veneno del alacrán *Centruroides suffusus suffusus* tiene 94 % de identidad con un péptido proveniente del veneno de *Centruroides sculpturatus*. Por otro lado, la fracción 3 del veneno de la serpiente de coral *Micrurus laticorallus* resultó ser una proteína ya identificada.

## 1. Introducción

La importancia de los canales iónicos radica en la múltiple cantidad de procesos fisiológicos en los que se ven involucrados. Esa característica los convierte en moléculas clave para el entendimiento de muchos procesos de señalización en los seres vivos, por lo que el estudio de sus propiedades es clave para entender algunas enfermedades relacionadas a canalopatías (Hille, 2003). El uso de compuestos de origen natural para estudiar e incluso clasificar a los canales iónicos es muy vasto, y es una práctica que data desde los comienzos de la investigación sobre la descripción de componentes celulares; incluso es en los compuestos naturales donde suelen buscarse componentes activos cuyos blancos sean canales iónicos de interés. Debido a la relevancia fisiológica de los canales iónicos es conveniente dar una breve revisión acerca de estas proteínas.

### 1.1.- Los canales iónicos

Embebidos en la membrana celular se encuentran los canales iónicos, proteínas responsables del transporte de iones hacia el interior o exterior de la célula. Estas proteínas forman un conducto a través del cual los iones ( $K^+$ ,  $Na^+$ , etc.) pasan de manera específica a favor de su gradiente electroquímico; a diferencia de los poros celulares, los canales se diferencian por ser estructuras proteicas que requieren de un cambio conformacional para que se lleve a cabo el transporte de iones (Alberts, 2012). Son responsables de mantener el equilibrio iónico en la célula, participan en los potenciales de acción (base de la comunicación en el sistema nervioso), intervienen en el ritmo cardiaco y el tono muscular. Los canales iónicos se clasifican en base a la naturaleza del estímulo al que responden; de acuerdo a esta clasificación podemos encontrar cuatro grupos de canales iónicos: los dependientes de voltaje, los dependientes de ligando, los que se activan por estímulos mecánicos, y los que se activan por luz (Cooper, 2009).

Existen mutaciones en los canales iónicos que derivan en anomalías en la estructura y función de los mismos; estas anomalías resultan en enfermedades llamadas canalopatías. Al relacionarse con padecimientos como epilepsia, ataxia, sensibilidad alterada al dolor, entre otras, y debido a su participación en procesos fisiológicos cruciales, los canales iónicos son blancos potenciales para el desarrollo de fármacos. Actualmente los canales iónicos ocupan el segundo lugar en la lista de blancos proteicos, donde los receptores acoplados a proteínas G son los primeros, para fármacos existentes o por descubrir (Overington *et. al.*, 2006).

El presente trabajo se enfocó en la búsqueda de compuestos activos aislados de venenos de animales venenosos, y el blanco elegido fue el canal iónico de sodio dependiente de voltaje isoforma 1.7 ( $Na_v$  1.7). Este receptor iónico se seleccionó por su relación con enfermedades relacionadas con la percepción del dolor.

## 1.2.- Canales de sodio dependientes de voltaje.

Los canales iónicos de sodio dependientes de voltaje ( $\text{Na}_v$ ) son glicoproteínas integrales de membrana que forman canales por los cuales el ion  $\text{Na}^+$  viaja de forma selectiva a favor de su gradiente electroquímico (Isom, 2001). Dichos canales se expresan en gran diversidad de organismos; en los mamíferos estos canales son proteínas heteroméricas compuestas de una subunidad alfa ( $\alpha$ ) formadora del poro de 260 kDa asociada a una o más subunidades beta reguladoras de aproximadamente 35 kDa (Dib-Hajj *et al.*, 2012; Catterall, 2000). Sin embargo, a pesar de contar con más de una subunidad, en los  $\text{Na}_v$  la conservación de sólo la subunidad  $\alpha$  es suficiente para mantener la función del canal iónico (Marban *et al.*, 1998). La estructura de la subunidad alfa posee una arquitectura modular y consiste en cuatro dominios (DI-DIV) unidos vía intracelular y extracelular por tres loops (LI-L3) mientras que cada dominio está conformado de seis segmentos transmembranales (SI-S6) (Laedermann *et al.*, 2015; Marban *et al.*, 1998). En cada dominio, cuatro de esos seis segmentos (S1-S4) forman parte del sensor de voltaje, y los dos segmentos restantes (S5-S6) se encargan de ser parte de la región del poro.

En la actualidad se conocen 9 isoformas de canales iónicos de sodio dependientes de voltaje ( $\text{Na}_v1.1$ - $\text{Na}_v1.9$ ). Los niveles de expresión de las distintas isoformas varían de manera específica en cada tejido. En cuanto a la función de los  $\text{Na}_v$ , en células excitables, ésta es muy importante para la generación y propagación de potenciales de acción. Además se han hallado mutaciones en cada isoforma que se relacionan con algún tipo de desorden (Tabla 1).

**Tabla 1.** Isoformas de canales  $\text{Na}_v$  que se encuentran en mamíferos, gen que codifica para cada isoforma, localización y algunas enfermedades ligadas a mutaciones de los  $\text{Nav}$  (Modificada de Ryupasinghe, 2014).

Isoforma	Gene	Localización	Enfermedad ligada a mutación
$\text{Na}_v$ 1.1	SCN1A	Soma y dendritas apicales del SNP y SNC	Epilepsia
$\text{Na}_v$ 1.2	SCN2A	Axones sin mielina del SNC y SNP	Epilepsia
$\text{Na}_v$ 1.3	SCN3A	SNC y SNP durante desarrollo embrionario	Incremento de expresión después de lesión nerviosa
$\text{Na}_v$ 1.4	SCN4A	Músculo esquelético	Miotonía y parálisis periódica
$\text{Na}_v$ 1.5	SCN5A	Músculo cardíaco	Arritmia cardíaca
$\text{Na}_v$ 1.6	SCN8A	Nodos de Ranvier de SNC y SNP	Atrofia cerebral y ataxia cerebelosa
$\text{Na}_v$ 1.7	SCN9A	SNP	Sensibilidad alterada al dolor, anosmia
$\text{Na}_v$ 1.8	SCN10A	SNP	Sensibilidad alterada al dolor y parestesia

Como señala la tabla 1, de las nueve isoformas de Na<sub>v</sub> existen cuatro que se han relacionado con la percepción del dolor, éstas son el Na<sub>v</sub> 1.3 (Waxman *et al.*, 1994), Na<sub>v</sub> 1.7, Na<sub>v</sub> 1.8 (Laedermann *et al.*, 2015) y el Na<sub>v</sub> 1.9.

### 1.3 Dolor y nocicepción

El dolor y la nocicepción son términos que aluden a la percepción de estímulos nocivos. El dolor se define como una experiencia sensorial y emocional no placentera asociada con un actual o potencial daño al organismo (Kandel, 2000) mientras que la nocicepción se refiere al proceso sensorial originado por algún estímulo y que desencadena dolor (Bear, 2007). A pesar de ser procesos estrechamente ligados cabe señalar que uno puede suceder sin el otro. El dolor se puede clasificar en base a su duración en dolor agudo o dolor crónico, además de ser una sensación subjetiva debido a que el mismo estímulo desencadena respuestas variables en distintos sujetos. El dolor es el fruto de una serie de procesos que involucran la participación de zonas del cerebro relacionadas con la cognición, por lo que el papel de los estímulos nocivos es importante más no indispensable durante el proceso de dolor. Por otra parte, durante la nocicepción ocurre un proceso de integración por parte del sistema nervioso central y periférico de información generada por un estímulo nocivo sobre terminaciones nerviosas sensoriales especializadas llamadas nociceptores (RAPLA, 2009). Los nociceptores, al recibir la señal de un estímulo nocivo (cuya naturaleza puede ser térmica, química o mecánica) la transmiten hacia el sistema nervioso central (SNC) a través de la médula espinal, donde la señal es enviada hacia el cerebro y hacia las neuronas motoras (Rupasinghe, 2014). Los nociceptores inervan la piel, órganos, tejido conectivo, músculos, etc. y se pueden clasificar en base al grado de mielinización que presentan.

### 1.4.- Canales iónicos y nocicepción.

Algunos otros receptores que se han asociado a la percepción del dolor son los canales de calcio de tipo N (N-Type Ca<sup>2+</sup>) son canales heteropoliméricos expresados únicamente por el sistema nervioso, principalmente localizados en la terminal pre-sináptica de neuronas aferentes que forman parte de la espina dorsal así como en el ganglio dorsal (Chen *et al.*, 2005) y contribuyen a la liberación de glutamato, ya que tras ser activados llevan a una mejor liberación del neurotransmisor (Rycroft *et al.*, 2007). Como el resto de los canales de calcio activados por voltaje (Ca<sub>v</sub>), estos canales tienen la particularidad de que al ser activados por un potencial de acción generan la liberación de neurotransmisores (Bourinet *et al.*, 2005).

Los receptores opioides se encuentran ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central, así como en nervios autonómicos y sensibles periféricos. Actúan como transductores de señal y se encuentran anclados a la superficie de la membrana neuronal (Henriksen y Willoch, 2008). Los receptores analgésicos de tipo opioide son la piedra angular de la mayoría de los tratamientos analgésicos hasta el día de hoy. Estos actúan sobre los tres tipos de receptores pertenecientes a esta familia los cuales son los *delta*, *mu* y *kappa*. La mayoría de los tratamientos que utilizan alguna de estas vías tiene una serie de efectos secundarios (*mu* y *kappa*), salvo por los receptores delta que son los ligandos para las encefalinas (Villarejo et al., 2001).

Los canales iónicos sensibles a ácido (ASIC) son expresados a través de todo el sistema nervioso central (CNS) así como en el periférico (PNS). En mamíferos se han encontrado 4 genes codificantes para canales ASIC, así como 2 “splicings” alternativos los cuales generan las variantes del tipo 1 y 2 (Donier *et al.*, 2008). Son canales catiónicos neuronales insensibles a voltaje y activados por protones extracelulares. En neuronas sensitivas los canales ASIC se encuentran relacionados con la percepción del dolor y la mecanorecepción, sin embargo su rol no está del todo claro. Estos canales disparan potenciales de acción después de la acidificación del medio extracelular (Baron et al., 2008). Evidencia experimental ha mostrado que los canales ASIC tienen un rol en la mecanosensación, pero su función exacta en la transducción de señales no está muy clara (Price *et al.*, 2000; Page *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2005).

Los receptores de potenciales transitorios vaniloides (TRPV) pertenecen a una familia de canales iónicos activados por ligandos y son permeables a  $Ca^{+2}$  y  $Na^{+}$ , los cuales se expresan por neuronas aferentes primarias. Cuando estos canales se activan, el canal se abre, lo cual permite el influjo de los iones de calcio y sodio, lo cual despolariza las fibras neuronales asociadas al dolor, iniciando los potenciales de acción en las terminaciones nerviosas y también modulan la liberación de neurotransmisores (Premkumar y Sikand, 2008), entre los ligandos que reconocen se encuentran moléculas lipofílicas. Sin embargo también pueden verse activados por protones extracelulares, así como estímulos físicos tales como el calor y cambios de presión osmótica (Kauer y Gibson, 2009). Uno de los canales de este tipo más estudiados es el TRPV1 el cual media la hiperalgesia inflamatoria térmica (Premkumar y Sikand, 2008).

### **1.5 El papel de los $Na_v$ en la nocicepción.**

Como fue mencionado, ahora hay cuatro isoformas de canales  $Na_v$  que han sido relacionados con la nocicepción (Tabla 1). El  $Na_v$  1.3 se expresa principalmente durante el desarrollo embrionario, y es difícil de detectarlo en el sistema nervioso de adultos. Aún así, el  $Na_v$  1.3 se ha reportado que se expresa nuevamente en neuronas adultas que han sufrido algún tipo de daño como axotomía y que se involucran en la hiperexcitabilidad que sufren

las neuronas del ganglio dorsal de la raíz después de sufrir daño alguno (Cummings *et al.*, 2001).

El Na<sub>v</sub> 1.8 se clasifica como resistente a la tetrodotoxina y se expresa en neuronas sensoriales ubicadas en los ganglios dorsales de la raíz (GDR) (Swanwick *et al.*, 2010). Se ha reportado que participa en vías de señalización de dolor neuropático e inflamatorio (Wang *et al.*, 2011); además, procesos de inflamación periférica o daño neuronal favorecen la expresión de mRNA de este canal en neuronas nociceptivas de los GDR (Black *et al.*, 2004).

El Na<sub>v</sub> 1.9 se clasifica como resistente a la tetrodotoxina, una toxina marina, y se expresa en los ganglios dorsales de la raíz (GDR) contribuyendo a la excitabilidad de las células. El Nav 1.9 es responsable de corrientes persistentes de sodio en los GDR y ha sido señalado como analgésico potencial debido a su expresión preferencial en neuronas tipo-C del GDR (Catterall *et al.*, 2005); además algunos experimentos con mutantes de este canal iónico sugieren que participa en respuestas inflamatorias al dolor (Amaya *et al.*, 2006).

El Na<sub>v</sub> 1.7 es localizado en neuronas periféricas como neuronas sensoriales olfatorias, somáticas periféricas, viscerales y de ganglios simpáticos aunque también se ha encontrado en células tumorales de busto y próstata (Dib-Hajj *et al.*, 2012). Este canal se ha distinguido como crucial en el proceso de nocicepción en humanos, aunque también se liga a otros procesos como el olfato, o el reflejo de toser (Ahn *et al.*, 2012); es codificado por el gen SCN9A, y se han reportado mutaciones en dicho gen que están asociadas a desordenes relacionados con la nocicepción. Por ejemplo, la ganancia de función de este gen se relaciona con la aparición de desorden de dolor paroxístico extremo (Fertleman *et al.*, 2006), mientras que la pérdida de función causa insensibilidad al dolor (Cox *et al.*, 2006). Dada su relación con estas vías de señalización de dolor, las interacciones con otras moléculas, así como las propiedades biofísicas del Na<sub>v</sub>1.7 ha sido objeto de estudio. Además este canal se ha vuelto blanco de muchas investigaciones de desarrollo de fármacos para el tratamiento de dolor crónico e hiperalgesia, y algunas otras relacionadas con vías nociceptivas (Ryupasinghe, 2014; Wang *et al.* 2011).

Gran parte de los datos sobre estos canales iónicos se obtiene de experimentos de electrofisiología y de hecho las estrategias experimentales para estudiar los canales iónicos han ido adecuándose a las necesidades de investigadores, refinándose y diversificándose para obtener cada vez más información acerca de las propiedades de estas proteínas.

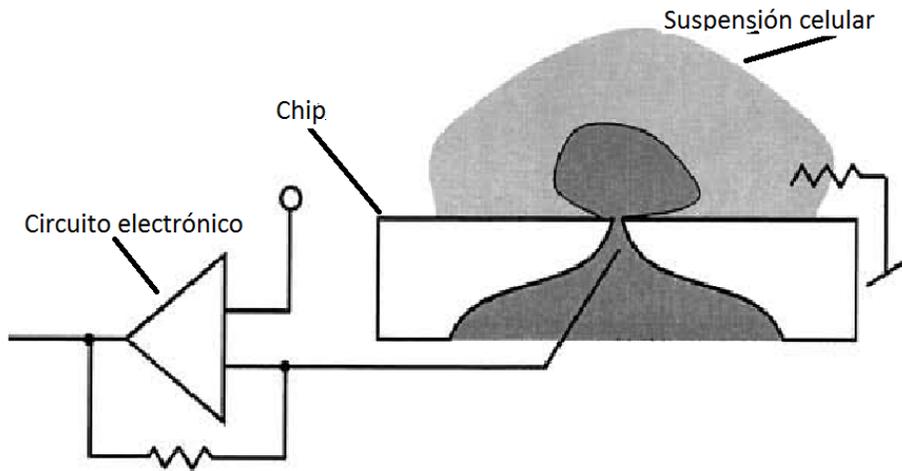
Como mencionado, en este proyecto se utiliza una de las técnicas experimentales modernas para el estudio de canales iónicos; dicha técnica es el patch-clamp automático. A continuación se presenta una breve revisión sobre el origen de esta, y otras técnicas predecesoras, así como algunas de sus ventajas como desventajas.

## 1.6 Métodos de estudio de los canales iónicos

A principio de la década de 1950 Alan Hodgkin y Andrew Huxley desarrollaron una técnica mediante el cual lograron registrar corrientes macroscópicas del axón de calamar gigante. Para el análisis de las propiedades de los canales iónicos la técnica más empleada hoy en día es la de patch-clamp. Desde su invención en 1976 (Neher y Sakmann, 1976) esta técnica ha sido muy útil para el estudio de canales iónicos activados por voltaje y también para los activados por ligando, ya que permite estudiar hasta un solo canal iónico.

Basado en los principios de otra técnica de electrofisiología llamada voltage-clamp, en el patch-clamp se emplea una pipeta de cristal cuya punta tiene un diámetro de alrededor de 1  $\mu\text{m}$ ; dicha pipeta se acerca lo suficiente a la membrana celular hasta hacer contacto con ella, y después, aplicando un poco de succión, se forma un sello (conocido como gigasello) que sirve para aislar el contacto entre la pipeta y la membrana, y lo que permite estudiar el flujo iónico de un canal iónico (ver anexos, figura A1). La pipeta está llena con una solución salina que tiene componentes similares a la de la solución extracelular fisiológica, y en contacto con esta solución se halla inmerso un electrodo de metal que se conecta a un circuito eléctrico encargado de medir el flujo de corriente. En un principio la técnica de patch-clamp era útil para conocer las propiedades de un solo canal, sin embargo, posteriormente se desarrollaron otras variables de esta técnica. Una de esas variables es la modalidad de whole-cell, en la cual se pueden medir los flujos iónicos correspondientes a todos los canales de una célula completa (ver anexos, figura A2).

Sin embargo la técnica de patch-clamp tiene limitaciones; la principal es que se necesita una gran experiencia por parte del operador del equipo para manipular las pipetas y hacer el parche en la célula. Debido a esto, desde el año 2002 se comenzaron a realizar pruebas para desarrollar equipos automáticos de patch-clamp. En el año 2004, la empresa Nanion Inc. desarrolló el Port-a-Patch, una estación de trabajo automatizada que funciona mediante un chip que reemplaza la pipeta del patch-clamp tradicional. En este equipo automático los principios teóricos son iguales al tradicional, pero sin que el operador tenga que hacer contacto con la célula mediante el uso de una pipeta de forma manual; en lugar de eso el usuario solo debe añadir una suspensión celular de confluencia aproximada (de 60-85 % según el manual) encima del chip, y azarosamente una célula se posiciona sobre la apertura del mismo (Figura 1).



**Figura 1.-** Esquema que ejemplifica el funcionamiento del sistema automático de patch-clamp; en la imagen se muestra el chip que realiza el papel de la pipeta del sistema manual, el circuito electrónico que mide y amplifica la señal del flujo iónico y se muestra una células que se ha posicionado en la apertura del chip. Imagen modificada de Fertig *et al.*, 2002.

Debido a las ventajas operacionales que ofrece el sistema de Port-a-Patch para realizar ensayos de patch-clamp, en este proyecto se utilizó dicho equipo automático para analizar el efecto de fracciones obtenidas de venenos del alacrán *Centruroides suffusus suffusus* (Css), y *Micrurus laticoralllis* (Mlat) sobre el canal iónico Nav 1.7.

## 2. Antecedentes

### 2.1.- Neurotoxinas de animales venenosos implicadas en nocicepción

La búsqueda de nuevos fármacos hacia receptores nociceptivos ha llegado a estudiar la posible utilidad de los venenos de animales, tal es el caso de los venenos de los conos marinos (Livett *et al.*, 2006). Estos moluscos producen un veneno bastante complejo el cual puede llegar a contener hasta 200 componentes distintos biológicamente activos (Buschmann, 2002).

La búsqueda de analgésicos en venenos de animales tiene como base conocimientos previos (mas no es la única razón), sobre la sintomatología provocada por éstos venenos en el ser humano, la cual podría estar relacionada con una actividad analgésica. Esta búsqueda ha dado como resultado el descubrimiento de péptidos con propiedades analgésicas en distintos organismos (Zhang *et al.*, 2007).

Uno de los mejores resultados obtenidos hasta el momento es el fármaco llamado Prialt, que es el nombre comercial de la  $\omega$ -Conotoxina MVIIA (que pertenece a una familia

de  $\omega$ -Conopéptidos que tienen un tamaño de entre 24 – 29 aminoácidos). La  $\omega$ -Conotoxina MVIIA se obtuvo del veneno del caracol marino denominado *Conus magus* y su acción analgésica se basa en el bloqueo de canales de calcio del tipo N. Este péptido completó satisfactoriamente sus fases de pruebas clínicas y fue aprobado por la FDA (Administración de Drogas y Alimentos, por sus siglas en inglés) para su uso terapéutico. En la actualidad el Prialt es utilizado en el tratamiento del dolor crónico, teniendo varias ventajas sobre los tratamientos tradicionales, ya que no se ha observado que provoque algún efecto secundario (McGivern, 2007) siempre y cuando se administre vía epidural, lo cual es una limitante de este fármaco.

El descubrimiento de la actividad analgésica de la  $\omega$ -Conotoxina MVIIA ha sido un aliciente en la investigación que se lleva a cabo en el estudio de venenos provenientes de animales ponzoñosos. Posteriormente se han encontrado péptidos con acción antinociceptiva en varias especies de animales venenosos, entre ellos alacranes, arañas, conos marinos, anemonas de mar, etc. (**Tabla 2**).

**Tabla 2. Ejemplos de péptidos con propiedades analgésicas provenientes de veneno y de secreciones de animales.** Se puede observar la gran variedad de fuentes de péptidos con propiedades analgésicas (Rajendra *et al.*, 2004).

Fuente	Péptido	Actividad	Referencia
<b>Veneno de alacrán</b>	BmK ITAP	Toxina contra insectos y analgésicos.	Xiong <i>et al.</i> , 1999
	BmK dITAP3	Depresor neurotóxico, anti-hiperalgesia periférica, anti-nociceptivo.	Guan <i>et al.</i> , 2001 <sup>a</sup>
	Bmk AS	Antinociceptivo y anti-hiperalgesia periférica.	Chen y Ji, 2002
	BmK AS1	Antinociceptivo potente.	Tan <i>et al.</i> , 2001
	BmK AGAP	Péptido analgésico anti-tumoral	Liu <i>et al.</i> , 2003
	BmK Ang P1	Analgésico	Guan <i>et al.</i> , 2001b
<b>Secreciones de piel de ranas</b>	Epibatidina	Antinociceptivo vía receptor colinérgico	Spande <i>et al.</i> , 1992
	Dermorfina	Agonista de receptores $\mu$ opioides	Negri <i>et al.</i> , 1992
<b>Veneno de arañas</b>	$\omega$ -Agatoxina	Antinociceptor de canales calcio del tipo P	Roerig y Howse., 1996
	IVA		
	Joro toxina	Inhibidor de receptores no-NMDA	Sorkin <i>et al.</i> , 2001
	Psalmotoxina 1	Bloqueador de canales activados por H <sup>+</sup> (ASIC)	Escoubas <i>et al.</i> , 2000
<b>Veneno de caracoles marinos</b>	$\omega$ -Conotoxina MVIIA	Inhibidor selectivo de canales de calcio de tipo N	Wang <i>et al.</i> , 1998
	$\omega$ -Conotoxina GVIA	Inhibidor selectivo de canales de calcio de tipo N	Plummer <i>et al.</i> , 1989
	Conantokina G	Inhibidor selectivo de N2RB	Malmberg <i>et al.</i> , 2003
	Conantokina T	Inhibidor de NR2A y NR2B	Klein <i>et al.</i> , 2001
	Mr 10 <sup>a</sup>	Potente Antinociceptivo	McIntosh <i>et al.</i> , 2000
	Contulakina G	Familia proteínica de neurotensinas	Craig <i>et al.</i> , 1999

## 2.2.- Canales iónicos y neurotoxinas

La evaluación del flujo iónico en presencia de diversos tipos de moléculas de origen natural ha sido uno de los enfoques de estudio de los  $\text{Na}_v$ . Muchas moléculas utilizadas en la descripción de la función y topología de los  $\text{Na}_v$  se han obtenido de venenos de animales y son de naturaleza proteica. Por ejemplo, se han utilizado componentes de venenos de alacrán, arañas, conos marinos, anemonas de mar, secreciones de anfibios, etc. En el laboratorio donde trabajamos se ha dado énfasis en buscar moléculas proteicas provenientes de venenos de alacranes y de arañas. En general los venenos de arácnidos contienen toxinas que afectan canales de sodio; en el caso de los escorpiones, estos poseen toxinas afines a canales iónicos  $\text{Na}_v$  que se clasifican en alfa ( $\alpha$ ) o beta ( $\beta$ ) según el sitio de unión al canal y su modo de acción (Hayes y Kruger, 2014). Las toxinas  $\alpha$  se caracterizan por ralentizar el procesos de inactivación del canal, mientras que las toxinas  $\beta$  afectan la activación del mismo (Deuis *et. al.*, 2017). Recientemente por nuestro grupo de investigación se han reportado la actividad biológica en los  $\text{Na}_v$  1.6 de la neurotoxina CssII del veneno del alacrán Ccss, y de la Magi4 proveniente del veneno de la araña *Macrothele gigas*. Por otra parte, los venenos de serpientes también son parte del trabajo del laboratorio, y dichos venenos son también ricas mezclas de compuestos proteicos y algunas especies, como las serpientes del género *Micrurus* pertenecientes la familia elapidae poseen péptidos ricos en puentes disulfuro, los cuales les dan una gran estabilidad y rigidez a las moléculas (al igual que la neurotoxinas de los venenos de los arácnidos); además el veneno de las serpientes que constituyen esta familia son altamente neurotóxicos y actúan a nivel de uniones neuromusculares, o bien con un efecto miotóxico (Carbajal-Saucedo *et al.*, 2014). Sin embargo, no se conocen estudios de venenos de elápidos que afecten canales de sodio dependientes de voltaje.

De este modo, en este trabajo se decidió trabajar con fracciones representantes de neurotoxinas de tres dedos del veneno de la serpiente de coral *Micrurus laticollaris* (Mlat.) y una fracción con actividad hipoglucémica del alacrán *Centruroides suffusus suffusus* (Ccss).

### **3. Justificación**

Dada la relación del canal  $\text{Na}_v$  1.7 con la nocicepción, el estudio de dicha proteína se ha vuelto relevante en el área farmacéutica para el desarrollo de analgésicos. Además el desarrollo de una técnica que permita evaluar el efecto de compuestos sobre los canales iónicos obteniendo resultados de manera eficiente es importante. El patch-clamp automático es una opción para lograr dicha meta, por lo que la estandarización de un protocolo con esta técnica se vuelve necesario. Así mismo, la vasta variedad de especies venenosas, así como de sus componentes proteicos en dichos venenos, en México nos impulsan a buscar componente que pudieran tener un efecto sobre los  $\text{Na}_v$ 1.7.

#### 4. Hipótesis

La interacción de fracciones de venenos del alacrán *Centruroides suffusus suffusus* y de la serpiente de coral *Micrurus laticorallus* causará un cambio en el flujo de iones del  $\text{Na}_v$  1.7.

#### 5. Objetivo General

Identificar fracciones aisladas de venenos de animales ponzoñosos con efectos sobre la actividad del canal  $\text{Na}_v$ 1.7, a través de la técnica de patch-clamp automático.

#### 6. Objetivos particulares

1. Separación de venenos de *Centruroides suffusus suffusus* y de *Micrurus laticollaris* mediante cromatografía en fase reversa.
2. Cultivo y mantenimiento de línea celular (células CHO) que expresen el canal  $\text{Na}_v$  1.7.
3. Estandarización de un método de cosecha de células que permita obtener células CHO saludables para realizar ensayos electrofisiológicos automáticos de patch-clamp.
4. Utilizar controles positivos y caracterizar el efecto de proteínas obtenidas del veneno de *Centruroides suffusus suffusus* y *Micrurus laticollaris* en el  $\text{Na}_v$  1.7.
5. Conocer la estructura primaria de alguna fracción de veneno con actividad sobre el  $\text{Na}_v$ 1.7.

#### 7. Metodología

##### 7.1. Cromatografía en fase reversa de venenos de alacrán y coralillo.

El veneno del alacrán *Centruroides suffusus suffusus* fue obtenido por estimulación eléctrica, y el veneno de la serpiente de coral *Micrurus laticollaris* fue obtenido por estimulación manual. Después de la cosecha u “ordeña” de veneno estos fueron almacenados a  $-20^\circ\text{C}$ . Antes de la separación cromatográfica los venenos fueron diluidos con una solución de agua con 0.1%TFA, y centrifugados. Ambos fueron separados mediante cromatografía en fase reversa realizada en un sistema de HPLC. Se usó una columna Vydac C18 de 250x4.6 mm con empaque de partículas de sílica de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro promedio. La elución se realizó utilizando un gradiente a partir de una solución acuosa de ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1% (solución A) adicionando una solución de

acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) con 0.1 % de TFA (solución B). El gradiente fue lineal de 0 a 60% de solvente B en 60 minutos, con un flujo de 1 mL/min. La detección se realizó a 230 y 280 nm de longitud de onda, y se colectaron las fracciones detectadas de cada veneno.

## **7.2 Cuantificación de fracciones**

Las fracciones fueron cuantificadas por cálculo de área bajo la curva del cromatograma correspondiente, y mediante lectura a 280 nm con un nanodrop. Para la lectura con nanodrop las muestras de resuspendieron en 100  $\mu\text{L}$  de agua y acetonitrilo al 50%, cargándose 2  $\mu\text{L}$  de muestra.

## **7.3 Espectrometría de masas y secuenciación N-terminal**

Las masas moleculares de las fracciones proteicas fueron determinadas con la ayuda del Dr. Zamudio del IBt. Las fracciones de proteína se reconstituyeron a una concentración final de 500 pmol / 5 microL de acetonitrilo al 50% con ácido acético al 1%, y se aplicaron directamente en un espectrómetro de masas Thermo Scientific LCQ Fleet ion trap mass spectrometer (San Jose, CA) mediante el sistema de jeringa de bombeo (Thermo). El eluato a 10 microL/min se dividió para introducir solo el 5% de la muestra en la fuente de nanopulverización (0.5 microL/min). La tensión de pulverización se ajustó a 1.5 kV y la temperatura capilar se ajustó a 150 °C. La fuente de fragmentación se hizo funcionar entre 25-35 V de energía de colisión, 35-45% (unidades arbitrarias) de energía de colisión normalizada y la exploración con banda ancha fue activado. Todos los espectros se obtuvieron en el modo de ion positivo. La adquisición y la deconvolución de datos se realizaron en el sistema PC Xcalibur para Windows NT.

La degradación N-terminal o degradación de Edman se realizó en un secuenciador de fase gaseosa automatizado Shimadzu PPSQ-31A (Shimadzu, Kyoto, Japón). La muestra de aproximadamente 10 microg se disolvió en 10  $\mu\text{L}$  de una solución de  $\text{CH}_3\text{CN}$  al 37% (v/v) y se aplicó en membranas de fibra de vidrio tratadas con TFA, pre-ciclado con Polybreno (Aldrich). Los datos se registraron utilizando el software Shimadzu PPSQ-31A.

## **7.4 Digestiones enzimáticas y determinación de estructura primaria de las fracciones de interés.**

Para las digestiones de la fracción 30 de alacrán se utilizó la endoproteinasa Asp-N, se tomaron 25  $\mu\text{g}$  del péptido puro y se disolvieron en 100  $\mu\text{L}$  de buffer carbonato de amonio, pH 7.8. Posteriormente se agregaron 2.5  $\mu\text{g}$  de la enzima Asp-N en una proporción 1:10, y se incubó por 18 h a temperatura ambiente. Posterior a la hidrólisis enzimática, los productos obtenidos se purificaron por rpHPLC utilizando una columna analítica C18 con gradiente de 0-60 % de la solución B en un tiempo de 60 min, y un flujo de 1 mL/ min. A cada fragmento colectado se le determinó su masa molecular y su secuencia a partir del N-terminal, esto con el fin de obtener su estructura primaria. La estructura de la fracción 3 de

elápido se determinó mediante secuenciamiento N-terminal y mediante un sistema MS/MS LTQ Orbitrap Velos con trampa de iones lineal de presión doble.

### 7.5. Cultivo de líneas celulares.

Las líneas celulares utilizadas para los ensayos de patch-clamp en este proyecto fueron células de ovario de hámster chino (CHO). Estas células expresan el canal  $Na_v 1.7$ . Las células CHO se crecieron en un medio de cultivo DMEM + 10% de suero fetal bovino (SFB) y geneticina al 1%. El medio de cultivo utilizado es distribuido por la empresa Sigma Aldrich, número de producto D7777; el medio contiene L-glutamina, 4.5 g/L de glucosa y 110 mg/L de piruvato de sodio. Dado que las células CHO utilizadas en este proyecto se adhieren a la placa donde se cultivan es necesario el uso de tripsina para desprenderlas. Para dicha tarea se utilizó el reactivo Tryple express distribuido por la empresa ThermoFisher Scientific, cabe señalar que la empresa maneja como confidencial la concentración de enzima que incluye el producto.

### 7.6. Ensayos electrofisiológicos

Los registros electrofisiológicos se realizaron con un equipo de registro automático fabricado y distribuido por la empresa Nanion Inc. En los experimentos se utilizó una clona de células CHO que sobre-expresara el  $Na_v 1.7$ . Las células utilizadas para los ensayos, generalmente, se encontraron por debajo del 80% de confluencia, y en un rango de uno a dos millones de células por mililitro. En este proyecto se seleccionó la fracción 30 de *C. suffusus suffusus* a concentraciones de 0.5  $\mu$ M y 1  $\mu$ M, y las fracciones 1, 2, 3 y 4 de *M. laticollaris* a una concentración de 1  $\mu$ M; se usaron dos protocolos distintos de estímulos para cada fracción analizada según el origen de cada fracción, de alacrán o de serpiente de coral (Figura 2).

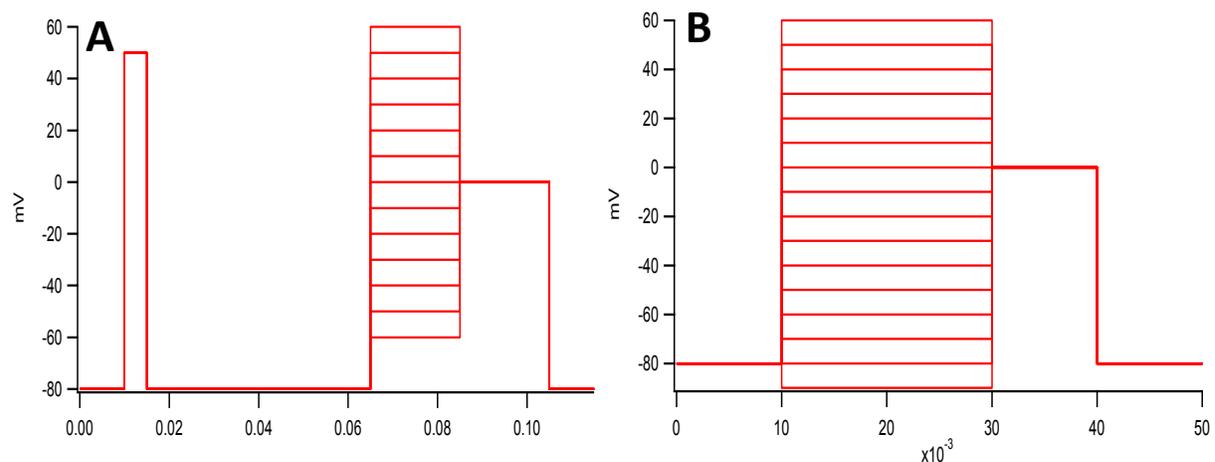


Figura 2.- Protocolos de estímulos construidos para pruebas de patch-clamp. A.- Se muestran los estímulos aplicados para probar los efectos de la fracción 30 de *Css.*; en el eje "x" se muestra la duración del pulso (medida en segundos), mientras que el voltaje se muestra en el eje "y". B.- Serie de pulsos utilizados para probar los efectos de las fracciones 1, 2, 3 y 4 de *Mlat.* El eje x representa la duración de los pulsos en segundos y el eje y representa el voltaje de cada estímulo.

### **7.7.- Alineamiento de secuencias.**

Una vez obtenidas las secuencias primarias de la fracción 30 de *Centruroides suffusus suffusus* y la fracción 3 de *Micrurus laticollaris* se realizó un alineamiento de las mismas para ver si presentaban homología con alguna secuencia ya conocida. Los alineamientos se hicieron en el programa BLAST DE NCBI.

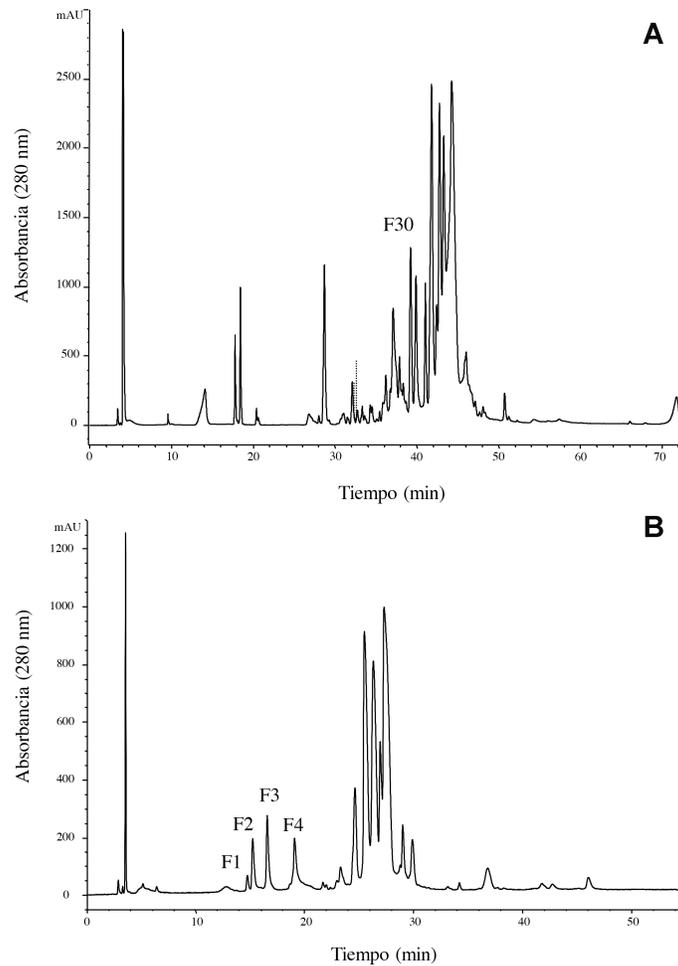
### **7.8 .Pruebas estadísticas**

Como parte del análisis estadístico se aplicaron pruebas de “*t*” pareadas de dos colas, se tomaron como significativas las diferencias con una  $p < 0.05$ .

## **8. Resultados**

### **8.1.- Separaciones de los venenos mediante cromatografía en fase reversa.**

Los venenos se fraccionaron por cromatografía en fase reversa en HPLC (rpHPLC). Las fracciones fueron cuantificadas en un nanodrop a una absorbancia de 280 nm, y también fueron calculadas por el área bajo la curva que se representan en el cromatograma de la figura 3. Los cromatogramas de las separaciones de los venenos de *C. suffusus suffusus* y *M. laticollaris* se muestran en la figura 3A y 3B..



**Figura 3.** Separación de venenos por cromatografía reversa. En la imagen se muestran los cromatogramas correspondientes a muestras de venenos del alacrán *C. suffusus suffusus* (A) y de la serpiente de coral *Micrurus laticollaris* (B). En ambos cromatogramas se señalan las fracciones de interés.

En ambos cromatogramas se observan los diferentes tiempos de elución de los componentes de acuerdo a las características de los venenos. Los componentes del veneno del alacrán *C. suffusus suffusus* muestran, en general, una mayor cantidad de componentes hidrofóbicos (tiempos de retención mayores a 40 min) comparado con los tiempos de retención en la separación de las fracciones provenientes del veneno de *M. laticollaris*. Es conocido que los venenos de alacranes del género *Centruroides* tienen un mayor contenido

de neurotoxinas peptídicas, lo cual contrasta con el contenido del veneno de las serpientes de coral del género *Micrurus*, las cuales tienen neurotoxinas peptídicas llamadas de tres dedos, y una cantidad significativa de fosfolipasas (Carbajal *et al.* 2013). En el veneno de *M. laticollaris*, las fracciones que eluyen en los minutos de 25 a 35 (bajo las condiciones ensayadas) representan fracciones de alfa-neurotoxinas (Carbajal *et al.*, 2013) que por su tamaño e hidrofobicidad eluyen generalmente en esos tiempos. Otros componentes de los venenos del género *Micrurus* son las fosfolipasas tipo A2, las cuales hidrolizan enlaces éster de fosfolípidos; induciendo inestabilidad en las membranas lipídicas de células musculares.

Las fracciones de ambos venenos fueron colectadas y secadas al vacío. Posteriormente se resuspendieron en 100  $\mu$ L de una solución con agua y acetonitrilo al 50%. La cantidad de proteína de las muestras se cuantificó por absorbancia a 280 nm y también por área bajo la curva (Anexos, Tabla A1 y A2).

Con las estimaciones de concentración en las fracciones proteicas se realizaron los cálculos para determinar la cantidad que se aplicaría en los ensayos de actividad en los canales  $Na_v1.7$ , tomando en cuenta que las masas moleculares de las neurotoxinas tanto del veneno del alacrán como del de serpiente de coral, éstas oscilan entre 6 y 8 kDa.

La fracción 30 de *C. suffusus suffusus* fue seleccionada, ya que esta fracción en previos experimentos se había relacionado a un efecto hipoglucemiante, donde los ratones tenían una conducta muy relajada y pasiva con respecto a otras fracciones del mismo alacrán. Por otro lado las fracciones 1, 2, 3 y 4 de *M. laticollaris* fueron seleccionadas, ya que estas fracciones representan neurotoxinas de tres dedos, las cuales han sido relacionadas con efectos en los receptores de acetil-colina, pero nunca a receptores de  $Nav$ , por lo cual se propuso explorar su estudio en los  $Nav1.7$ .

## **8.2.- Estandarización de cosecha del cultivo celular.**

Los ensayos de patch-clamp se realizaron en una línea celular estable de células CHO que sobrepresan el canal  $Na_v 1.7$ . Antes de realizar dichas pruebas se estandarizó el método de cosecha de las células; de tres condiciones probadas se eligió aquella cuyas células presentaban sellos más estables y de magnitudes más altas. Los métodos de cosecha fueron diferentes en dos etapas; 1) la cantidad de volumen de tripsina con la que se trataron las células; y 2) en si eran sometidas o no a un proceso de centrifugación. Las condiciones se muestran en la tabla 3. Dado que la concentración de tripsina es desconocida en el Tryple express se usó como referencia de partida el volumen necesario para cubrir la superficie de la placa; dicho volumen es igual a 300  $\mu$ L, en la búsqueda de condiciones

idóneas para cosechar las células no se usó un volumen menor a este. En cuanto al tiempo y velocidad de centrifugación los valores fueron de 1 minuto y 1,000 rpm.

**Tabla 3.** Condiciones experimentales para cosecha de células CHO que sobre expresan el canal Na<sub>v</sub> 1.7.

Condición	Vol. tripsina	Vol. final	Centrifugación
1	500 µL	1,000 µL	No
2	1 mL	400 µL	Si
3	300 µL	100 µL	Si

De las condiciones probadas, la mejor fue aquella en la que las células se trataron con 300 µL de tripsina y no se centrifugaron. Bajo estos parámetros se realizó la cosecha de células para realizar los ensayos de patch-clamp.

### 8.3.- Ensayos electrofisiológicos.

Después de la cuantificación de las fracciones, se probó el efecto de dos fracciones peptídicas (una de *C. suffusus suffusus* y otras de de *M. laticollaris*) sobre el canal Na<sub>v</sub> 1.7 mediante ensayos electrofisiológicos. Se realizaron ensayos de patch-clamp del tipo “whole-cell” para determinar el efecto de las fracciones sobre el canal Na<sub>v</sub> 1.7. Los ensayos se llevaron a cabo en una línea celular estable de células CHO que sobre expresan el canal antes mencionado. Se ensayaron la fracción 30 de C<sub>ss</sub>, y las fracciones 1 a 4 de M<sub>lat</sub>. En el caso de la fracción 30 se hicieron pruebas con dos concentraciones (0.5 y 1 µM) mientras que las fracciones 1, 2, 3 y 4 de *M. laticollaris* solo se evaluó a 1 µM, esto por la poca cantidad de muestra disponible. Se midieron cambios de corriente máxima en presencia de las fracciones. Los ensayos se realizaron a concentraciones estimadas, asumiendo una masa molecular promedio de 7 kDa una vez obtenida su masa molecular experimental (7,290.1 Da para la F30, y de 6,681.6 Da para la M<sub>lat</sub>3, o fracción 3, la cual fue positiva en los ensayos electrofisiológicos). La curva de intensidad en función de voltaje (curva I-V) para cada célula probada se muestra en las figuras anexas (figuras B1-B6). Los valores de pico de corriente del canal fueron normalizados con la corriente máxima de cada registro control y después promediados

#### 8.3.1.- Curvas I-V y de conductancia en presencia de fracción 30 de C<sub>ss</sub>.

La curva I-V promedio de activación e inactivación de las células probadas para la fracción (F30) de C<sub>ss</sub> a 0.5 µM se muestran en la figura 4. En la curva de activación se observaron diferencias significativas a -10 mV según el análisis estadístico (t-student; p<0.05) con respecto al control. En dicha diferencia se aprecia un aumento del pico de

corriente en presencia de la fracción 30; dicho aumento fue casi del 15%. Además, pese a que las medias comparadas no fueron significativas, las diferencias se observaron desde -30 mV, lo cual sugiere un efecto similar a las toxinas tipo  $\beta$  de alacrán. Los trazos que presentaron diferencias se muestran en la figura 5.

Por otra parte, la curva I-V de inactivación del canal  $Na_v 1.7$  muestra un decremento significativo de 7% a -30 mV en presencia de la fracción 30 de C<sub>ss</sub> (figura 4). Los otros puntos de la gráfica no muestran diferencias significativas, e incluso se aprecian variaciones en el pico de corriente únicamente de -60 a -30 mV (figura 5).

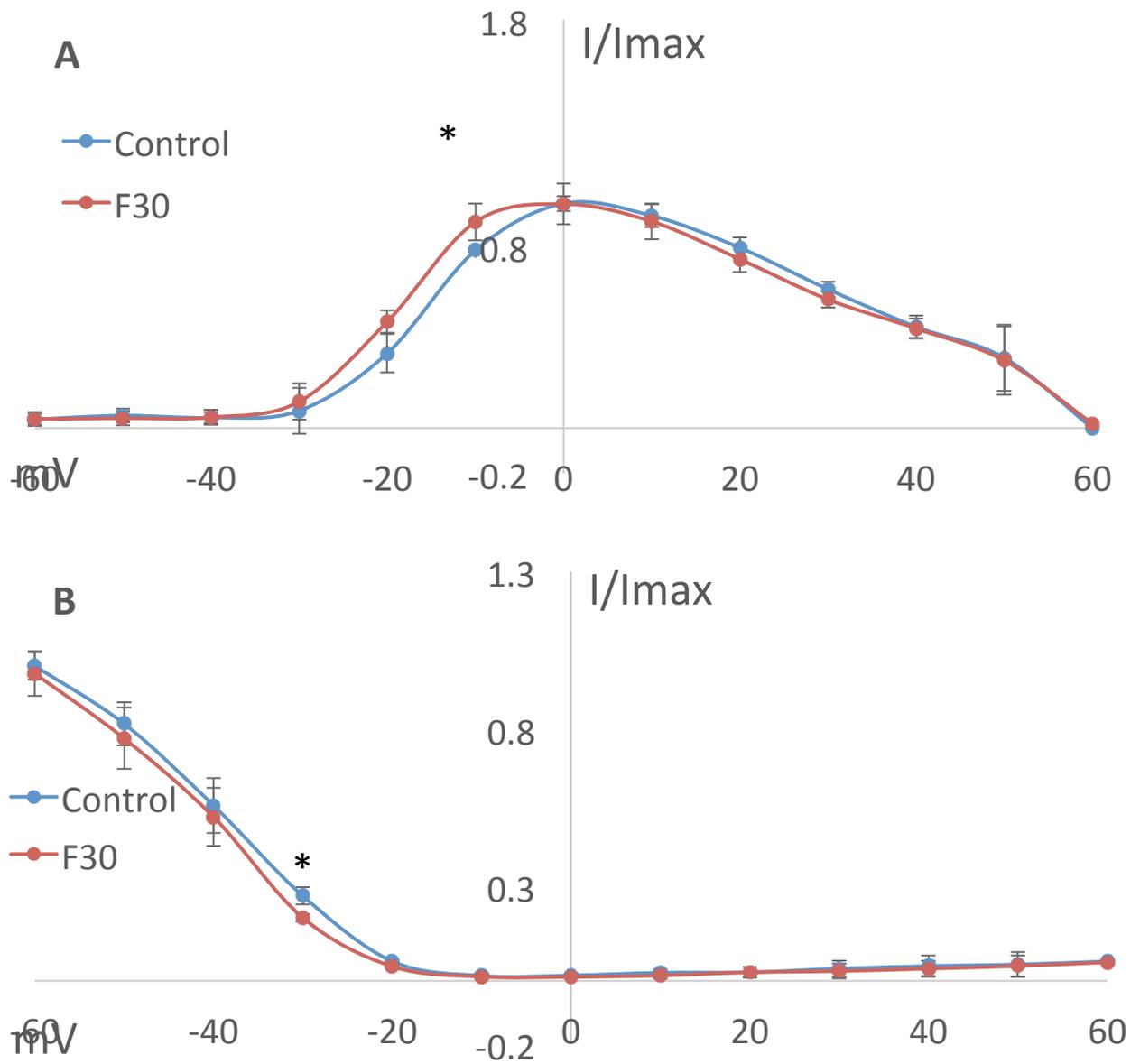


Figura 4.- Curvas de corriente - voltaje correspondientes a pruebas con fracción 30 de C<sub>ss</sub> a 0.5  $\mu$ M. (A) curva de activación promedio que muestra diferencias en picos de corriente sólo

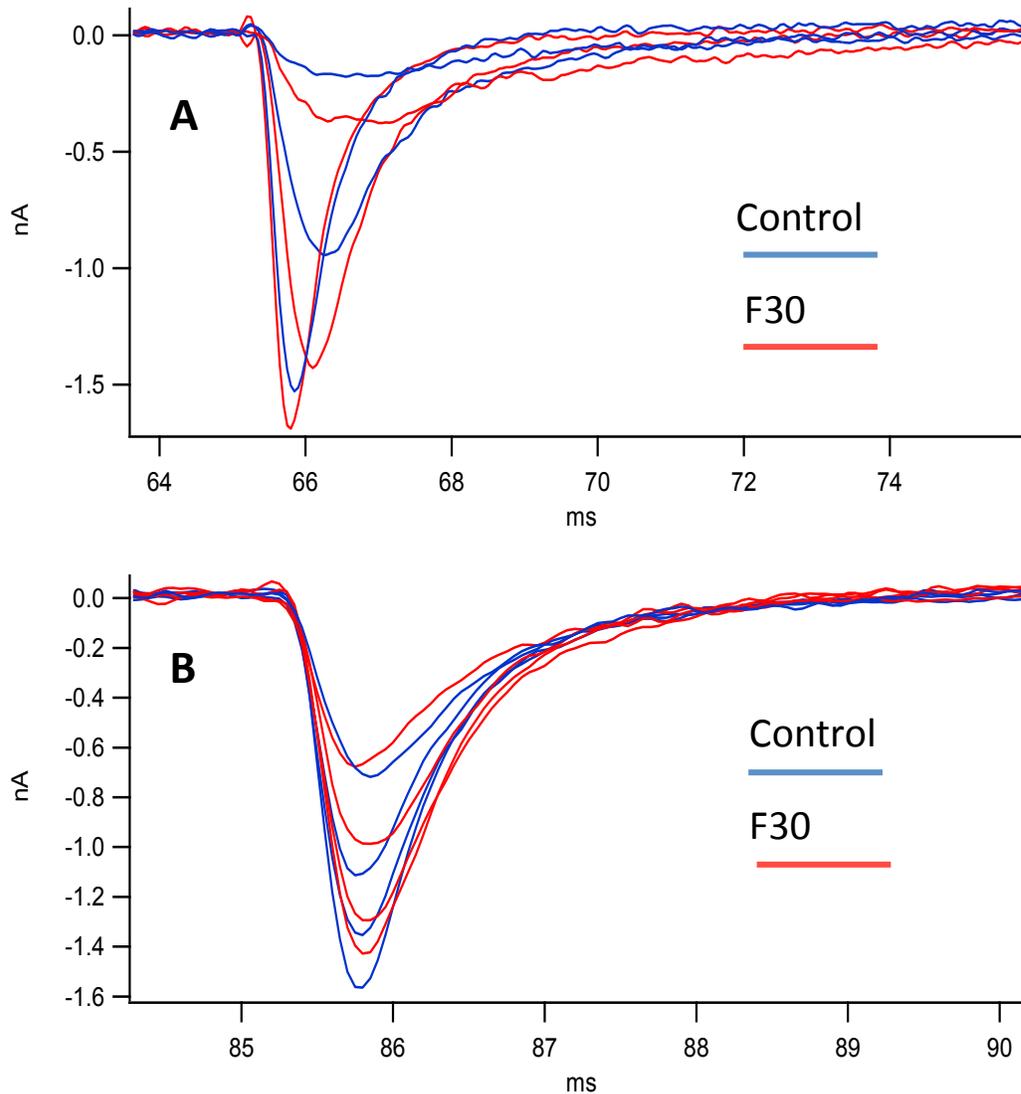


Figura 5.- Trazos de registro en presencia de la fracción 30 de C<sub>ss</sub>.; en el eje x se representa el tiempo en milisegundos y la intensidad en nano amperes en el eje y. A.- Los trazos corresponden a estímulos de -30 a -10 mV graficados en la curva de activación. B.- Trazos de la curva de inactivación que corresponden a los estímulos de -60 a -30 mV.

Para corroborar la tendencia del efecto que presenta la fracción 30 de C<sub>ss</sub> sobre el canal Na<sub>v</sub> 1.7 se repitieron los ensayos de patch-clamp con el mismo protocolo de estímulos pero al doble de concentración. En la figura 6 se muestran las curvas I-V de activación (figura 6A) e inactivación (figura 6B) del canal Na<sub>v</sub> 1.7 a una concentración de 1 μM. Como se

observa en la figura 6, la presencia de la fracción 30 no modificó el comportamiento del flujo de iones en canal Nav1.7, por lo que la probabilidad de un efecto biológico fue descartada.

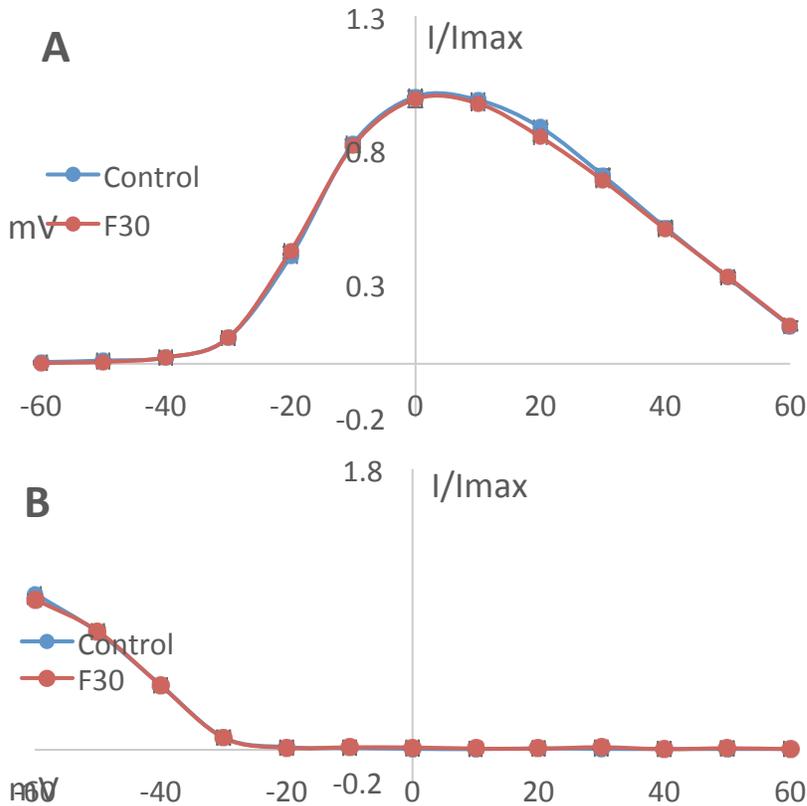
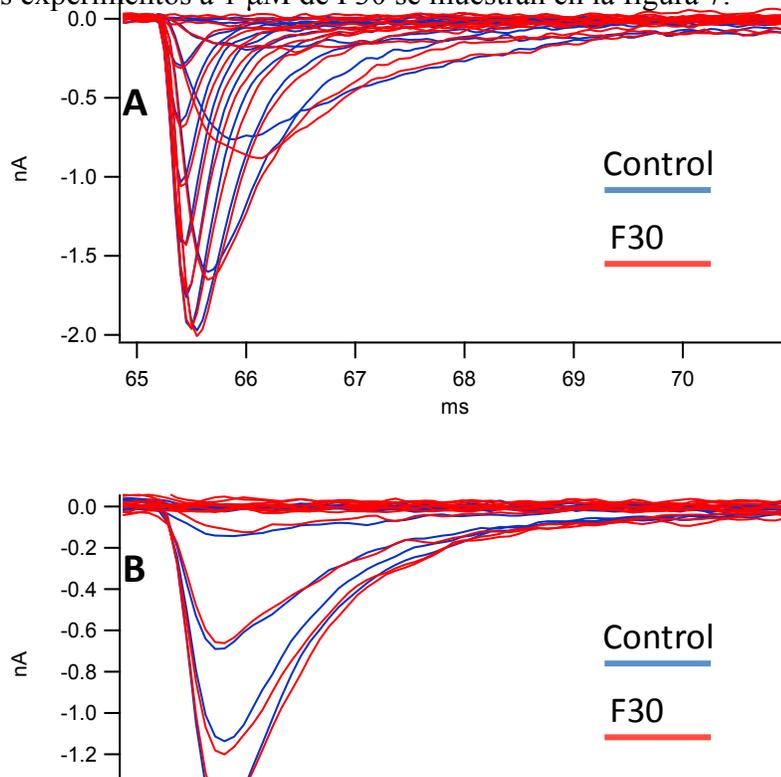


Figura 6.- Curvas de corriente voltaje de pruebas con F30 a 1  $\mu$ M. (A) la curva de activación no mostró cambios en la actividad del canal. (B) La curva de inactivación no mostró cambios en el canal  $Na_v$  1.7. Una prueba estadística de t de student se realizó y mostró que no había diferencias significativas (n=3).

Los trazos promedio de los experimentos a 1  $\mu$ M de F30 se muestran en la figura 7.

Figura 7.- Trazos correspondientes al promedio de las pruebas hechas con la F30 1  $\mu$ M de C<sub>ss</sub>. (A) trazos que corresponden a la activación del  $Na_v$  1.7; (B) trazos de la inactivación del canal.



### 8.3.2 Ensayos de patch-clamp con fracciones de *Micrurus laticollaris*

Figura 6.- Curvas de relación corriente voltaje de pruebas de MlatF1 a 1  $\mu\text{M}$ . Los datos fueron normalizados al pico corriente más grande del control en cada protocolo; una prueba de "t" pareada indica sólo una diferencia significativa con respecto al grupo control (indicada con asterisco, n=4).

inactivación (figura 8).

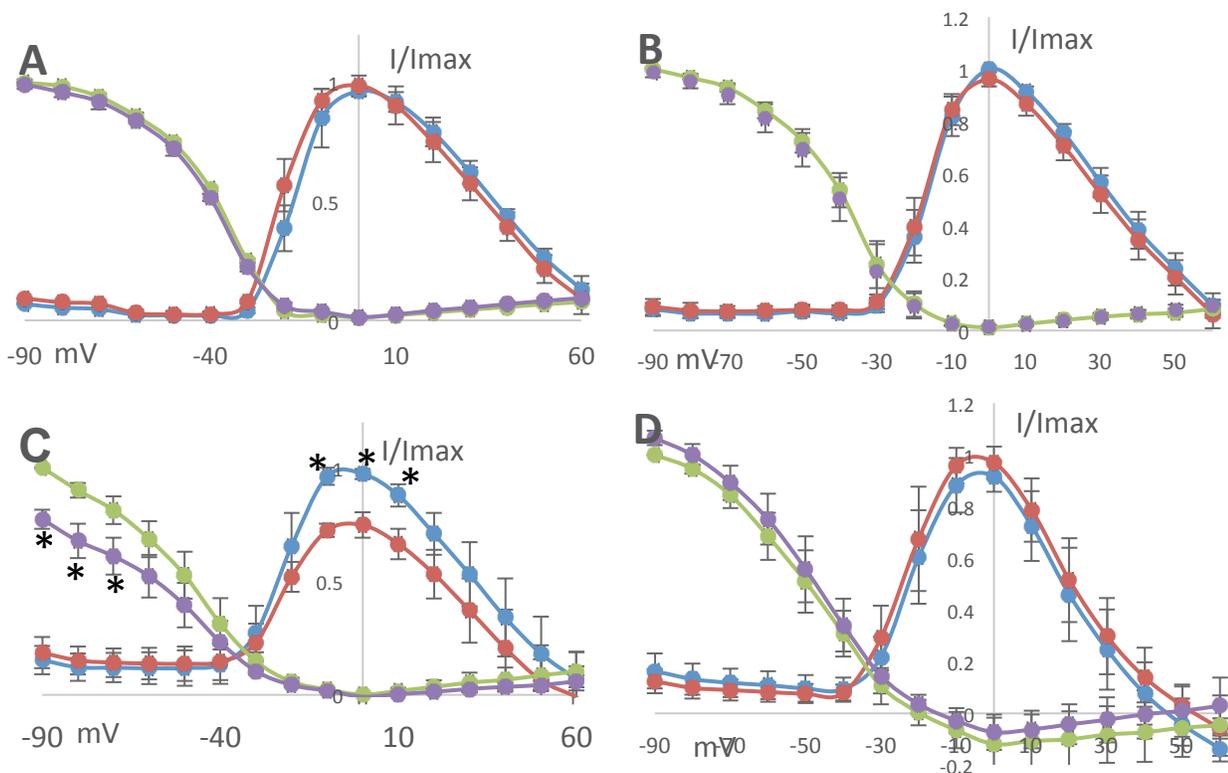


Figura 8.- En cada gráfica se incluyen ambos tipos de curva I-V (activación e inactivación), cada una corresponde a una fracción distinta de Mlat probada en los ensayos electrofisiológicos. Todas las fracciones se probaron a una concentración estimada de 1 $\mu\text{M}$ . En azul y rojo la activación control y en presencia de muestra, respectivamente. En verde y morado la inactivación control y en presencia de muestra, respectivamente. En (A) se muestran las curvas obtenidas de ensayos con la F1, n=3; (B) datos originados de pruebas con F2, n=4; (C) ensayos

De las 4 fracciones probadas únicamente la F3 mostró resultados con diferencias significativas. La F3 provocó bloqueos del 24, 23 y 21% en estímulos de -10, 0 y 10 mV,

respectivamente en la activación del canal, mientras que en la curva de inactivación se observó un decremento de 23, 22 y 20% del pico de corriente en los estímulos de -90, -80 y -70 mV. Los trazos de la F3 que presentaron diferencias significativas se muestran en la figura 9.

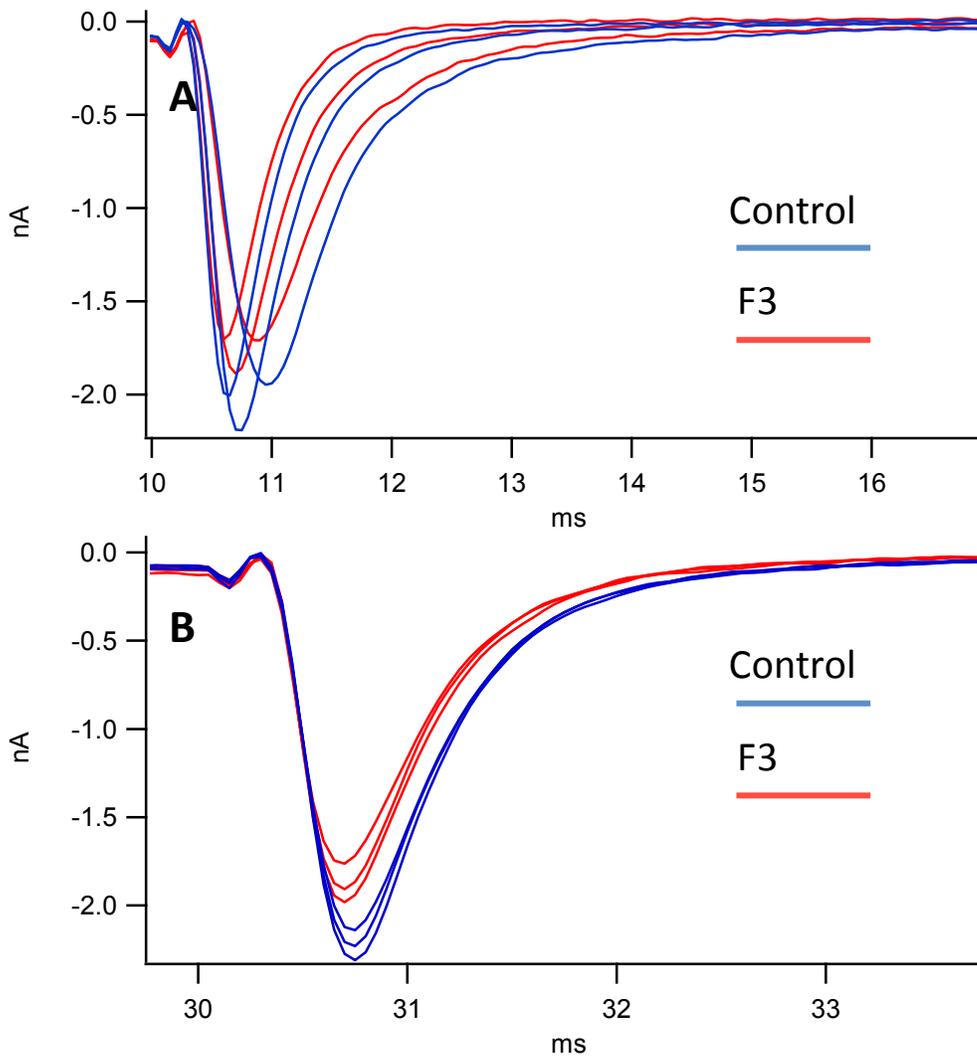
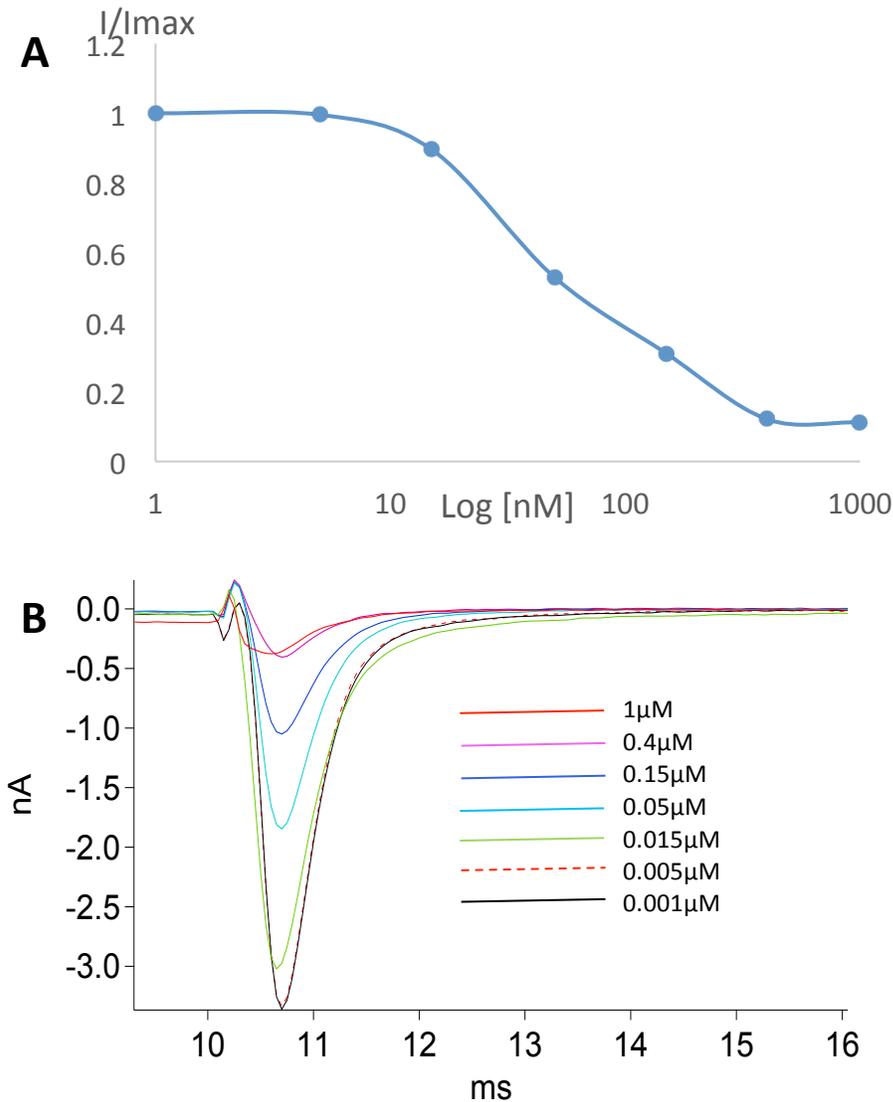


Figura 9.- Trazos de ensayos con la F3 de Mlat. (A) Se muestran los trazos de la curva de activación que tuvieron diferencia significativa. (B) Puntos en los que se presentaron diferencias significativas en la inactivación del canal Na<sub>v</sub> 1.7.

### 8.3.3 Ensayos con controles positivos, tetrodotoxina y Atx-II.

Además de las pruebas con fracciones de veneno de alacrán y de serpiente de coral, se realizaron pruebas con toxinas cuyo efecto sobre canales de sodio es conocido. Se

hicieron ensayos en una célula añadiendo distintas concentraciones de tetrodotoxina (TTX), empezando por la más baja. Los valores de pico máximo de corriente se graficaron en función de la dosis administrada, a manera de curva dosis-respuesta (figura 10A). En la gráfica se aprecia que la respuesta del canal se asemeja a lo reportado; además también se incluyen los trazos del registro (figura 10B).



**Figura 10.-** Ensayos con TTX en el canal  $Na_v 1.7$ . (A) Curva dosis-respuesta, las dosis probadas fueron 0.001, 0.005, 0.015, 0.05, 0.15, 0.4 y 1  $\mu M$ . (B) Se muestran los trazos del registro; cada trazo representa una dosis distinta de TTX.

Además de los ensayos con TTX, también se hicieron pruebas con una toxina de la anemona *Anemonia sulcata*, la Atx-II. Dicha toxina pertenece al grupo 1 de toxinas que afectan los  $Nav$  y se unen al sitio 3 de dichos canales, y por tanto afecta su proceso de

inactivación. Las curvas I-V de los registros en presencia de esta toxina se muestran en la figura 11.

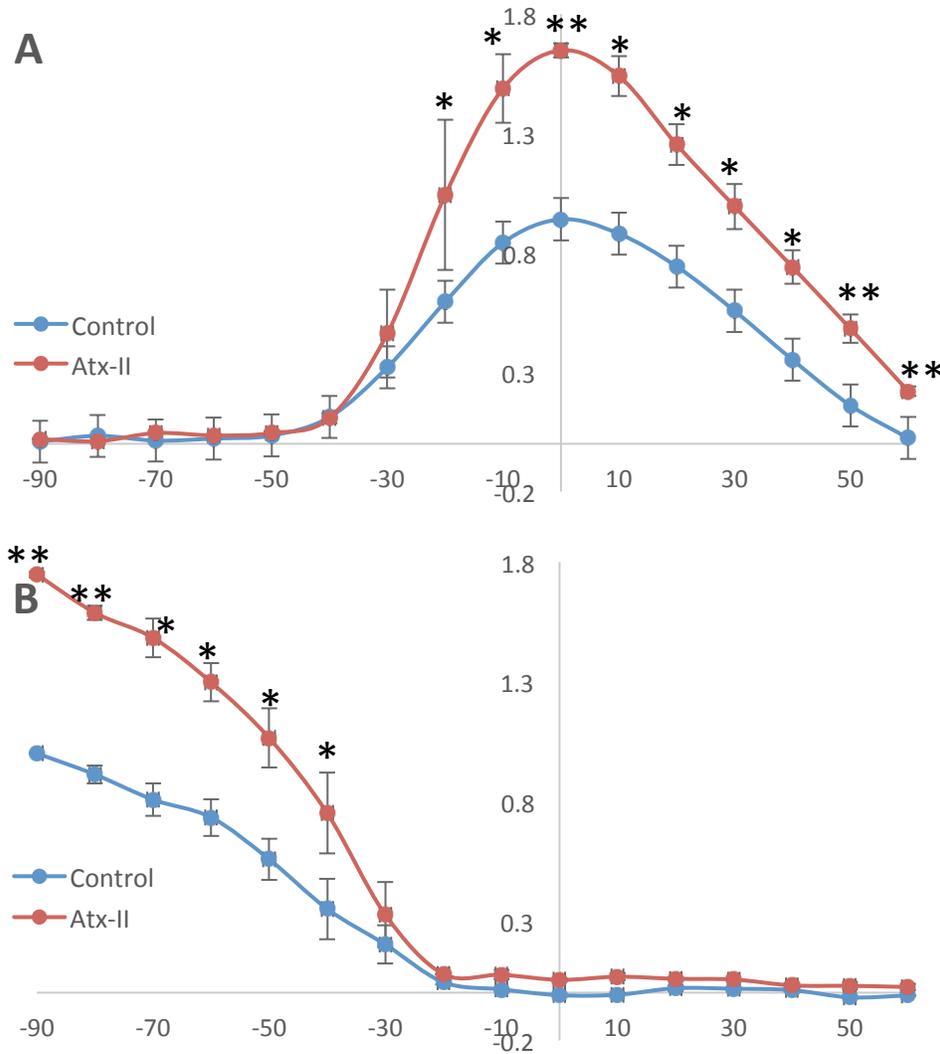


Figura 11.- Curvas corriente-voltaje de los registros en presencia de Atx-II a 2.5 nM. (A) Curva de activación del canal  $Na_v$  1.7,  $*=p<0.05$ ,  $**=p<0.01$ ; (B) Curva I-V de inactivación,  $*=p<0.05$ ,  $**=p<0.01$ ; se aplicó una prueba t de student para ver las diferencias significativas,

Los registros fueron obtenidos a una concentración de 2.5 nM del péptido y como se observa en la figura 11, la Atx-II ocasionó el efecto ya conocido sobre el  $Na_v$  1.7, esto es, ralentizando la inactivación del canal y provocando un aumento en la entrada de sodio (Wanke *et. al.*, 2009). Los aumentos en el pico de corriente fueron hasta de un 70 % más con respecto al grupo control. Los trazos del registro se muestran en la figura 12, se

incluyen todos los trazos juntos (figura 12A) y (aislado de los otros trazos) el que presentó mayor aumento en la entrada de sodio (figura 12B).

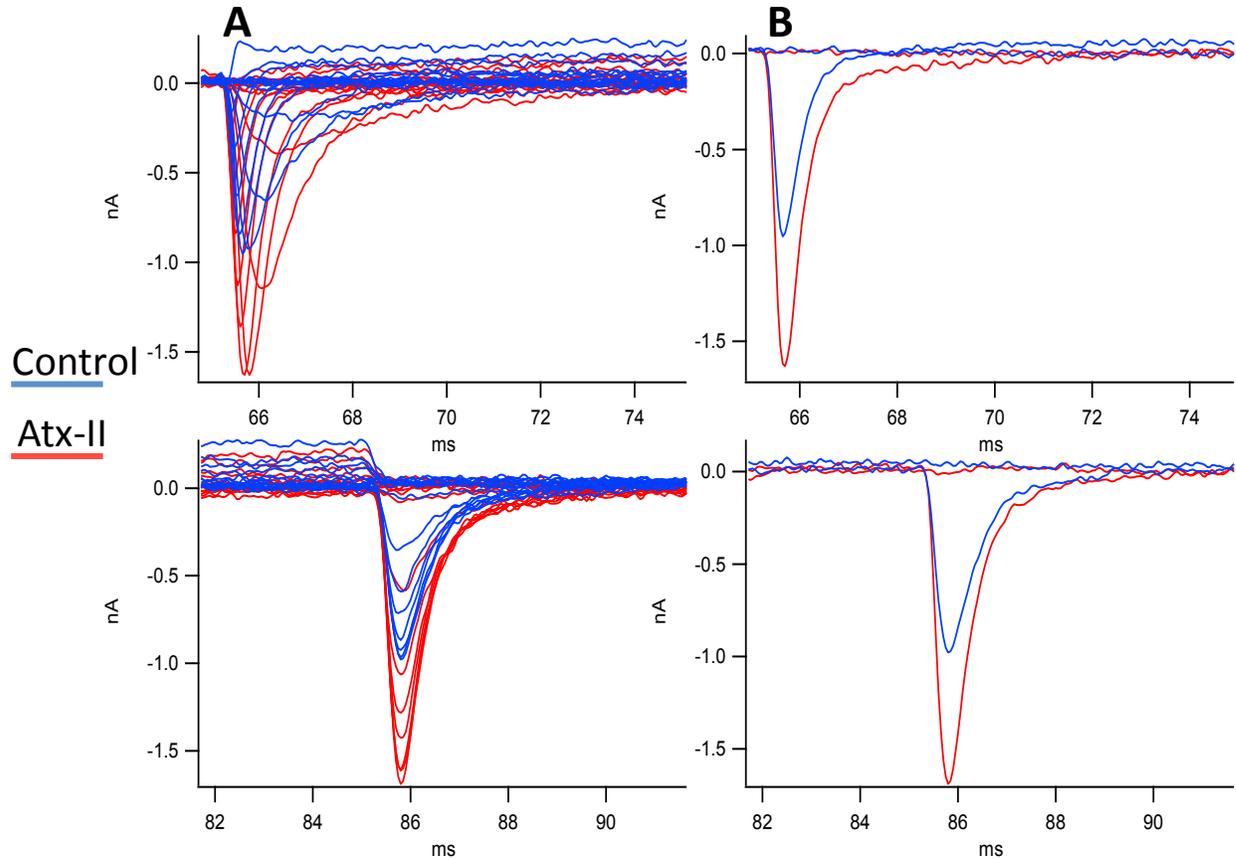


Figura 12.- Trazos de experimentos de patch-clamp en presencia de la Atx-II a 2.5 nM. (A) se muestran los trazos correspondientes a un protocolo de estímulos completo, y en (B) únicamente se muestra el estímulo a 0 mV (arriba) y a -90 mV (abajo).

#### 8.4 Estructura primaria de la F30 de *C. s. suffusus*

Aunque la F30 del veneno del alacrán *C. s. suffusus* no resultó activa hacia el Nav1.7, se procedió a determinar su masa molecular por espectrometría de masas, y también a determinar su estructura primaria. Esta decisión fue parte del ejercicio de entender y conocer los procesos químicos de elucidación de estructura primaria de neurotoxinas. La fracción 30 fue reducida/alkilada, y posteriormente secuenciada a partir de su N-terminal (**Tabla 4**). La secuenciación directa por degradación de Edman determinó solamente 25 aminoácidos, por lo que este fue hidrolizado enzimáticamente con la endoproteinasa Asp-N con el objetivo de determinar la estructura primaria completa. Los

fragmentos peptídicos obtenidos por hidrólisis enzimática, fueron separados por rpHPLC, secados y analizados por espectrometría de masas. Posteriormente los aminoácidos de dichos fragmentos fueron analizados por degradación de Edman (N-terminal) para obtener la estructura primaria de cada fragmento, y así construir la estructura primaria completa.

**Tabla 4.** Secuencia de aminoácidos de la fracción 30 del alacrán *C. s. suffusus*

	Amino acid sequence	Theo	Exp	$\Delta$
Edman	<b>KQGYLVYEDTGCRYMCSKLGENSYC</b>	2,911.3	7,290.1	4,378.8
1Asp-N	----- <b>DTGCRYMCSKLGENSYC</b>	1,930.1	1,930.1	0
2Asp-N	----- <b>DEECKAKTEGIG</b>	1,279.3	1,279.3	0
3Asp-N	----- <b>DGYCQNKACYCRGLPEGTKTWPMFGKSC</b>	3,145.6	3,144.6	1.0
F30	<b>KQGYLVYEDTGCRYMCSKLGENSYCDEECKAKTEGIGDGYCQNKACYCRGLPEGTKTWPMFGKSC</b>	7,291.2	7,290.1	1.1

La suma de las masas moleculares (MW) de la secuencia N-terminal obtenida por degradación de Edman, y de los fragmentos obtenidos por hidrólisis enzimática (2Asp-N y 3Asp-N) corresponden a la masa experimental del péptido de 7,290.1 Da considerando tres molécula de agua liberadas por la hidrólisis del enlace peptídico, la MW de la secuencia completa corresponde a 7,290.1 Da, lo cual concuerda con la MW inicial determinada teóricamente ( $MW_{exp(i)} 7,291.2$  Da) mas 1 unidad de masa atómica (uma). La diferencia de 1 uma se debe a que la proteína se encuentra seguramente amidada en el C-terminal, como se ha observado en varias neurotoxinas de este género de alacrán.

### 8.5 Estructura primaria de la F3 de *M. laticorallis*

La masa molecular del péptido F3 del elápido *M. laticorallis* fue también determinada por espectrometría de masas (6,681.6 Da). Posteriormente el péptido fue alquilado/reducido y secuenciado a partir de su N-terminal (**Tabla 5**). La secuenciación directa por degradación de Edman determinó solamente 16 aminoácidos, pero debido a la poca cantidad con que se contaba, esta fracción fue sometida a una fragmentación MS/MS en un equipo LC-MS/MS, Q-Exactive Plus, con tecnología Orbitrap marca Thermo Scientific. La F3 previamente al análisis MS/MS fue alquilada/reducida e hidrolizada con tripsina.

**Tabla 5.** Secuencia de aminoácidos de la fracción 3 del elárido *M. laticoralis*.

	Amino acid sequence	Theo	Exp	$\Delta$
Edman	<b>RICYNQSSQPPTTKT</b>	2,911.3	6,683.6	3,770.3
MS/MS 1	<b>DHRGTIIER</b>	1,096.2	1,095.6	0.6
MS/MS 2	<b>GCACPNVKPGIQISCCTSDKCNG</b>	2,298.7	2,297.1	1.6
MS/MS 3	<b>ICYNQSSQPPTTK</b>	1,594.8	1,594.8	0
MS/MS 4	<b>TCSEGQCYK</b>	1,018.1	1,017.4	0.7
MS/MS 5	<b>TWRDHRGTIIER</b>	1,539.7	1,538.8	0.9
F3	<b>RICYNQSSQPPTTKTTCSEGQCYKKTWRDHRGTIIERGCACPNVKPGIQISCCTSDKCNG</b>	6,681.5	6,681.6	0.1

La suma de las masas moleculares (MW) de la secuencia N-terminal obtenida por degradación de Edman, y de los fragmentos obtenidos por fragmentación MS/MS corresponden a la masa experimental del péptido de 6,681.6 Da, lo cual concuerda con la MW inicial determinada teóricamente ( $MW_{exp(i)} 6,681.5$  Da). En este tipo de neurotoxinas no se ha reportado la amidación del C-terminal.

## 8.6 Alineamientos

Los alineamientos de la secuencia de aminoácidos se hicieron en el programa BLAST de NCBI. La F30 mostró un 93 % de identidad con una toxina tipo CsE8 del alacrán *Centruroides sculpturatus*, mientras que la F3 de *Micrurus laticollaris* resultó ser una neurotoxina de tres dedos previamente identificada (Carbajal *et al.*, 2014) (Tabla 6). La razón por la que no se identificó antes la F3 como ya reportada se debió a la detección usada en la corrida cromatográfica fue distinta al usada en el artículo.

Fracción	Alineamiento
<b>F30 de <i>Centruroides suffusus suffusus</i></b>	F30: KQGYLVYEDTGCRYMCSKLGENSYCDEECKAKTEGIGDGYCQNKACYCRGLPEGTKTWPM F30: KQGYLVYEDTGCRY CSKLGENSYCDEECKAKTEGIGDGYCQNKACYCRGLP G KTWPM CsE8: KQGYLVYEDTGCRYKCSKLGENSYCDEECKAKTEGIGDGYCQNKACYCRGLPYGAKTWPM
<b>F3 de <i>Micrurus laticollaris</i></b>	F3: RICYNQSSQPPTTKTTCSEGQCYKKTWRDHRGTIIERGCACPNVKPGIQISCCTSDKCNG 3FT: RICYNQSSQPPTTKTTCSEGQCYKKTWRDHRGTIIERGCACPNVKPGIQISCCTSDKCNG

Tabla 6.- Se muestran los alineamientos de la F30 y la F3.

## 9. Discusión

Se evaluó la actividad sobre el  $\text{Na}_v$  1.7 de cinco fracciones, una extraída del veneno del alacrán *C. suffusus suffusus* (F30), y las otras cuatro de la serpiente de coral *M. laticollaris* (F1, F2, F3 y F4). Para la F30 se realizaron pruebas con dos concentraciones distintas (0.5 y 1  $\mu\text{M}$ ). Las curvas de activación e inactivación no mostraron cambios significativos en las pruebas con 0.5  $\mu\text{M}$  de la F30 (figura 3). Sin embargo se observó cierta tendencia a modificar la voltaje dependencia del canal, por lo que se realizó una prueba a una concentración mayor de F30. Las pruebas a concentración de 1  $\mu\text{M}$  (figura 6) no mostraron reducciones significativas e incluso se aprecia que el comportamiento del  $\text{Nav}1.7$  no cambió. Esta evidencia sirve para descartar algún posible efecto sobre el canal  $\text{Na}_v$  1.7, sin embargo no se puede afirmar lo mismo sobre otros  $\text{Nav}$ . Respecto a la tendencia observada en las pruebas a 0.5  $\mu\text{M}$  de F30, estos resultados se puede explicar debido a la variación natural de la célula, ya que las diferencias son mínimas y ni siquiera son significativas.

Las pruebas con las fracciones de *M. laticollaris* (figura 8) señalan que la F1, F2 y F4 no presentaron efectos sobre el  $\text{Nav}1.7$ , mientras que la F3 bloquea el  $\text{Nav}1.7$  con una reducción significativa del 24%. Como ya se mencionó anteriormente los venenos de coralillo contienen  $\alpha$ -neurotoxinas, las cuales tienen generalmente un efecto específico en canales de acetilcolina. La F3 o Mlat3 muestra un comportamiento interesante ya que parece tener afinidad también por el  $\text{Nav}1.7$ . La secuencia primaria de la F3 servirá para comparar con las otras fracciones del veneno de la serpiente de coral *M. laticollaris* y así sugerir posibles dominios de aminoácidos que puedan estar involucrados en el reconocimiento o bloqueo al  $\text{Nav}1.7$ .

Este trabajo también es importante para sentar las bases del uso del patch-clamp automático en otras pruebas que involucren otros canales iónicos.

## 10.-- Conclusiones

Se desarrolló un protocolo de cosecha celular distinto al sugerido en el manual del Port-a-Patch. El protocolo propuesto dio estabilidad y una buena magnitud del sello formado durante las pruebas de patch-clamp. También se lograron obtener condiciones óptimas para la cosecha de células y se logró realizar pruebas con componentes de venenos sobre el  $\text{Nav} 1.7$ . Solo una fracción la Mlat3 presentó un efecto bloqueador de corriente de sodio a través del  $\text{Nav}1.7$ . Los ensayos con controles positivos con tetrodotoxina y la Atx-II confirmaron el protocolo utilizado en los ensayos de patch clamp automático.

Con la estandarización de este método se logrará hacer más eficiente la búsqueda de péptidos de interés terapéutico.

### **Perspectivas**

Una vez lograda la estandarización de un nuevo método de cosecha para pruebas de patch-clamp que permite el registro de hasta 8 células por día, el siguiente paso es la evaluación de fracciones en varios canales iónicos. Además se vuelve necesario hacer ensayos preliminares en modelos animales para hacer más específica y certera la búsqueda de fracciones con actividad sobre canales iónicos.

### **Referencias**

Ahn, H. S., Black J. A., Zhao P., Tyrrell L., Waxman S. G., Dib-Hajj S. D. (2011). The Nav<sub>v</sub>1.7 is the predominant sodium channel in rodent olfactory sensory neurons. *Mol. Pain*, 7, 32.

Baron, A., Voilley, N., Lazdunski, M., and Lingueglia, E. (2008) Acid sensing ion channels in dorsal spinal cord neurons., *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 1498-508.

Black J. A., Liu S., Tanaka M., Cummins T. R., Waxman S. G. (2004). Changes in the expression of tetrodotoxin-sensitive sodium channels within dorsal root ganglia neurons in inflammatory pain. *Pain*, 108, 237–247.

Bourinet, E., and Zamponi, G. W. (2005) Voltage gated calcium channels as targets for analgesics., *Current topics in medicinal chemistry* 5, 539-46.

Buschmann, H., Christoph, T., Friderichs, E., Maul, C., Sundermann, B., and Ed, J. L. (2002) Analgesics : from chemistry and pharmacology to clinical application, *Pharmacology*, pp 3-527.

Carbajal-Saucedo A., López-Vera E., Bénard-Valle M., N. Smith E., Zamudio F., de Roodt A. R., Olvera-Rodríguez. (2013). A. Isolation, characterization, cloning and expression of an alpha-neurotoxin from the venom of the Mexican coral snake *Micrurus laticollaris* (Squamata: Elapidae). *Toxicon*, 66, 64-74.

Carbajal-Saucedo A., Stuani F. R., Dal Belo C. A., Olvera-Rodríguez A., Alagón A., Rodrigues-Simioni L. (2014). Neuromuscular activity of *Micrurus laticollaris* (squamata: elapidae) venom in vitro. *Toxins*, 6, 359-370.

Chen, J.-Q., Zhang, Y.-Q., Dai, J., Luo, Z.-M., and Liang, S.-P. (2005) Antinociceptive effects of intrathecally administered huwentoxin-I, a selective N-type calcium channel blocker, in the formalin test in conscious rats. *Toxicon*, 45, 15-20.

Chow C. Y., Cristofori-Armstrong B., Undheim A. B., King G. F., Rash L. D. (2015). Three peptide modulators of the human voltage-gated sodium channel 1.7, an important analgesic target from the venom of an australian tarantula. *Toxins*, 7, 2494-2513.

Committee on Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals. (2009). *Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals*.

Cox J.J., Reimann F., Nicholas A. K., Thornton G., Roberts E., Springell K. (2006). An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature*, 444, 894–898.

Deuis J. R., Mueller A., Israel M. R., Vetter I. (2017). The pharmacology of voltage-gated sodium channel activators . *Neuropharmacology*, 1-22.

Dib-Hajj S. D., Yang Y., Black J. A., Waxman S. G. (2012). The Na<sub>v</sub>1.7 sodium channel from molecule to man. *Nature*, 14, 49-62.

Donier, E., Rugiero, F., Jacob, C., and Wood, J. N. (2008) Regulation of ASIC activity by ASIC4--new insights into ASIC channel function revealed by a yeast two-hybrid assay., *The European journal of neuroscience* 28, 74-86.

Fertleman C. R., Baker M. D., Parker K. A., Moffatt S., Elmslie F. V., Abrahamsen B. (2006). SCN9A mutations in paroxysmal extreme pain disorder: allelic variants underlie distinct channel defects and phenotypes. *Neuron*, 52, 767–774.

Hayes W. A., Kruger L. C. (2014). *Principles and methods of toxicology*. Sexta edición, 992.

Henriksen, G., and Willoch, F. (2008) Imaging of opioid receptors in the central nervous system., *Brain* 131, 1171-96.

Isom L. (2001). Sodium channel  $\beta$  subunits: anything but auxiliary. *Neuroscientist*, 7, 42–54.

Jones, R.C., Xu L., and Gebhart G.F. (2005) The mechanosensitivity of mouse colon afferent fibers and their sensitization by inflammatory mediators require transient receptor potential vanilloid 1 and acid-sensing ion channel 3. *J Neurosci* 25(47), 10981-9

Kauer, J. a, and Gibson, H. E. (2009) Hot flash: TRPV channels in the brain., *Trends in neurosciences* 32, 215-24.

Klint J. K., Smith J., Vetter I., Rupasinghe D. B., Er S. Y., Senff S., Herzig V., Mobli M., Lewis R. J., Bosmans F., King G. F. (2015). Seven novel modulators of the analgesic target Nav 1.7 uncovered using a high-throughput venom-based discovery approach. *British J Pharmacology*, 172, 2445-2458.

Laedermann C. J., Abriel H., Decosterd I. (2015). Post-translational modifications of voltage-gated sodium channels in chronic pain syndromes. *Frontiers in pharmacology*, 6, 1-20.

Livett, B. G., Sandall, D. W., Keays, D., Down, J., Gayler, K. R., Satkunanathan, N., and Khalil, Z. (2006) Therapeutic applications of conotoxins that target the neuronal nicotinic acetylcholine receptor., *Toxicon* 48, 810-29.

McGivern, J. G. (2007) Ziconotide: a review of its pharmacology and use in the treatment of pain., *Neuropsychiatric disease and treatment* 3, 69-85.

Neher E, Sakmann B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260(5554):799-802.

Page, A.J., Brierley S.M., Martin C.M., Martinez-Salgado C., Wemmie J.A., Brennan T.J., Symonds E., Omari T., Lewin G.R., Welsh M.J., and Blackshaw L.A. (2004) The ion channel ASIC1 contributes to visceral but not cutaneous mechanoreceptor function. *Gastroenterology* 127, 1739-47.

Premkumar, L. S., and Sikand, P. (2008) TRPV1: a target for next generation analgesics., *Current neuropharmacology* 6, 151-63.

Price, M.P., McIlwrath S.L., Xie J., Cheng C., Qiao J., Tarr D.E., Sluka K.A., Brennan T.J., Lewin G.R., and Welsh M.J. (2001) The DRASIC cation channel contributes to the detection of cutaneous touch and acid stimuli in mice. *Neuron* 2001. 32, 1071-83

Rajendra, W., Armugam, A., and Jeyaseelan, K. (2004) Toxins in anti-nociception and anti-inflammation., *Toxicon*, 44, 1-17.

Rycroft, B.K., Vikman K.S., and Christie M.J. (2007) Inflammation reduces the contribution of N-type calcium channels to primary afferent synaptic transmission onto NK1 receptor-positive lamina I neurons in the rat dorsal horn. *J Physiol* 580, 883-94.

Ryupasinghe D. B. (2014). Developing novel analgesics to treat the chronic pain (t esis de doctorado). University of Queensland, Australia.

Villarejo Díaz, M. (2001) Farmacolog a de los agonistas y antagonistas de los receptores opioides. *Rev. Hosp. Met.* 1, 65-97

Wang W, Gu J, Li Y. Q., Tao Y. X. (2011). Are voltage-gated sodium channels on the dorsal root ganglion involved in the development of neuropathic pain?. *Molecular Pain*, 7, 7-16.

Wanke E., Zaharenko A. J., Redaelli E., Schiavon E. (2009) Actions of sea anemone type 1 neurotoxins on voltage-gated sodium channel isoforms. *Toxicon*, 54, 1102-1111.

Waxman S. G., Kocsis J. D., Black J. A. (1994) Type III sodium channel mRNA is expressed in embryonic but not adult spinal sensory neurons and is reexpressed following axotomy. *J Neurophysiology*, 72, 466–470.

Zhang, M.M., Green, B.R., Catlin, P., Fiedler, B., Azam, L., Chadwick, A., Terlau, H., McArthur, J.R., French, R.J., Gulyas, J., Rivier, J.E., Smith, B.J., Norton, R.S., Olivera, B.M., Yoshikami, D., and Bulaj, G. (2007) Structure/function characterization of microconotoxin KIIIa, an analgesic, nearly irreversible blocker of mammalian neuronal sodium channels. *J Biol Chem* 282, 30699-706.

## Anexos

### Tablas.

Tabla A1.- Cantidad de proteína correspondiente a fracciones del veneno de *Micrurus laticorallis*.

Fracción	Lectura a 280 nm ( $\mu\text{g}$ )	Área bajo la curva ( $\mu\text{g}$ )
1	36	63
2	81	145
3	61	70
4	57	42

Tabla A2.- Cantidad de proteína correspondiente a fracciones del veneno de *C. suffusus suffusus*

Fracción	Lectura a 280 nm ( $\mu\text{g}$ )	Área bajo la curva ( $\mu\text{g}$ )
29	128.4	179.0
30	371.4	557.1
31	223.5	326.3
32	148.2	219.3
33	127.2	180.6
34	377.0	516.5

## Figuras

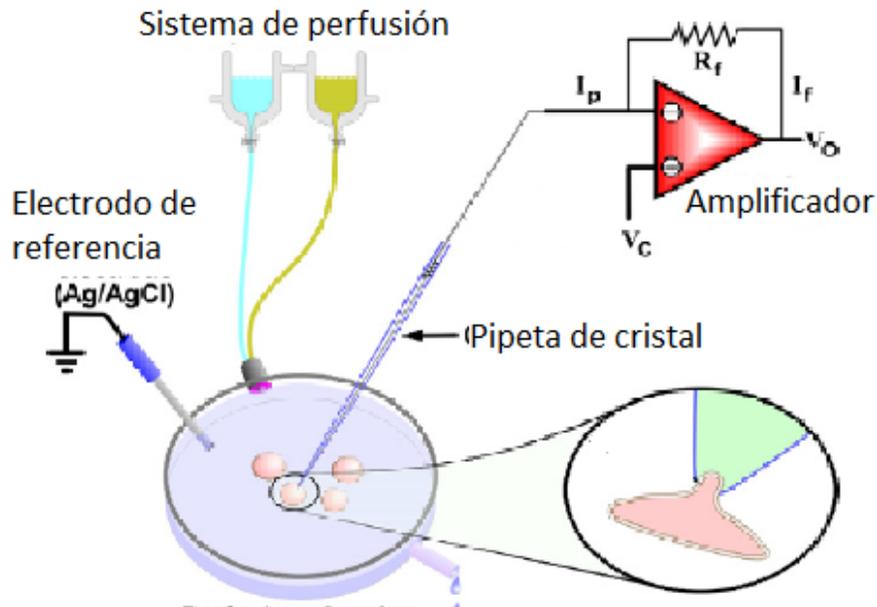


Figura A1.- Equipo de patch-clamp. En la figura se muestran algunos de los instrumentos para realizar un patch-clamp; además se muestra un esquema que ilustra la interacción de la pipeta con la célula. Modificada de Conforti, 2012.

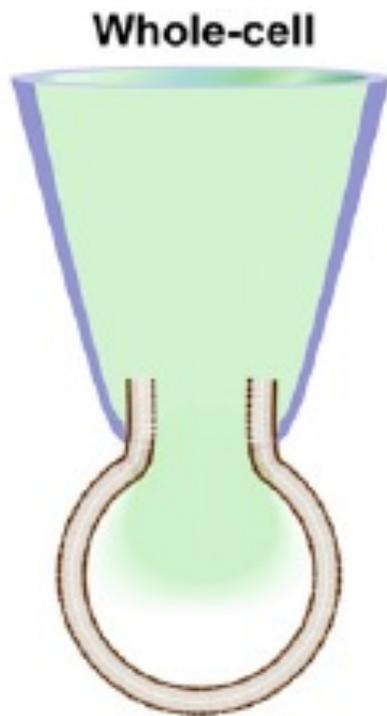
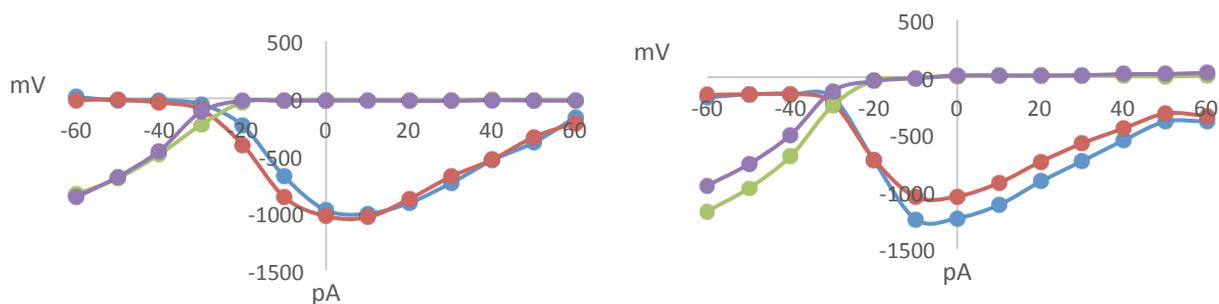


Figura A2.- En la figura se muestra como es la interacción de la pipeta con la célula en un experimento de Patch-clamp, en su variante de "whole-cell"; en esta variante se mide el flujo iónico correspondiente a una célula entera.



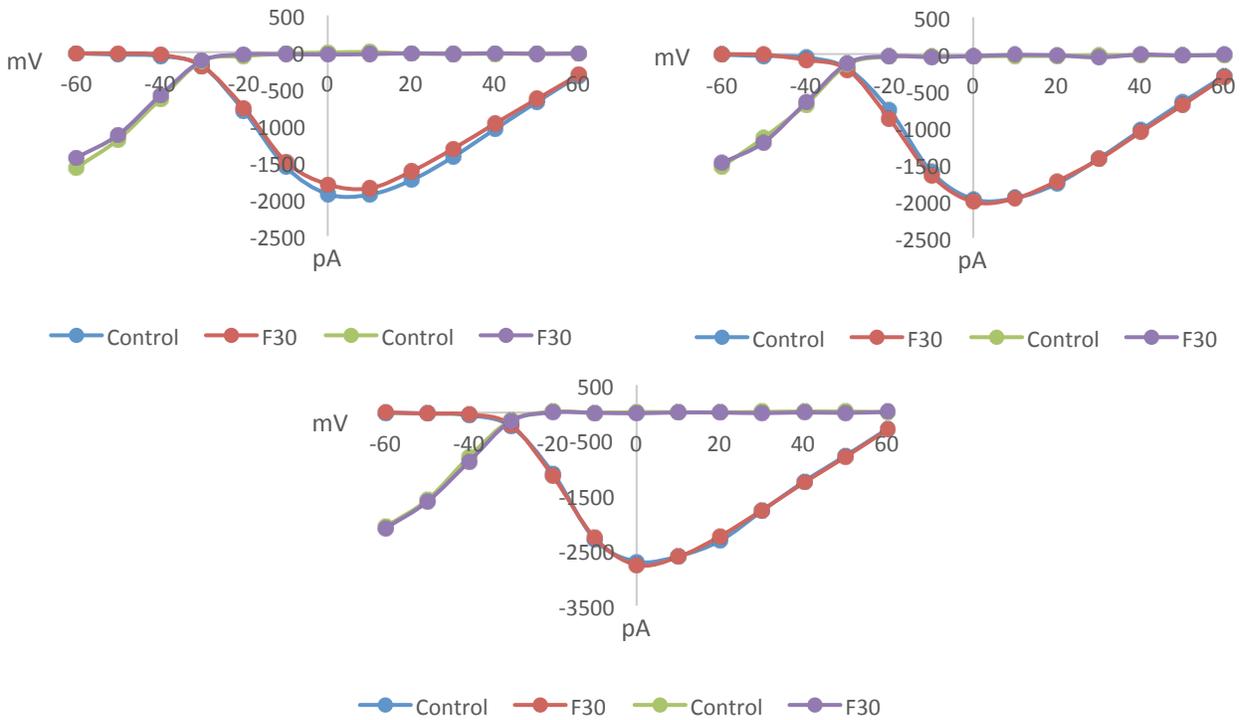


Figura B2.- Curvas I-V de registros con F30 1  $\mu\text{M}$ . Cada gráfica representa curvas de activación e inactivación de ensayos en presencia de la F30.

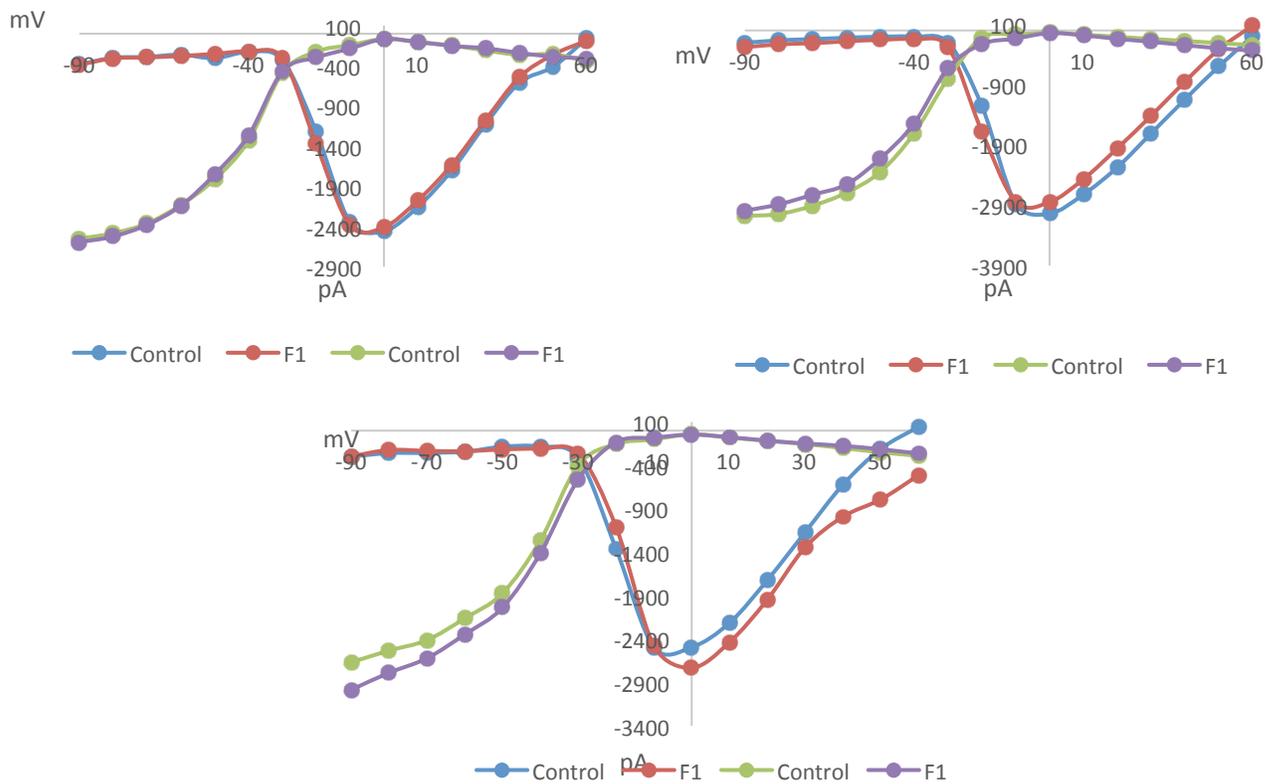


Figura B3.- Registros en presencia de F1 de *Micrurus laticollaris*. En cada gráfica se muestran juntos los valores de activación e inactivación.

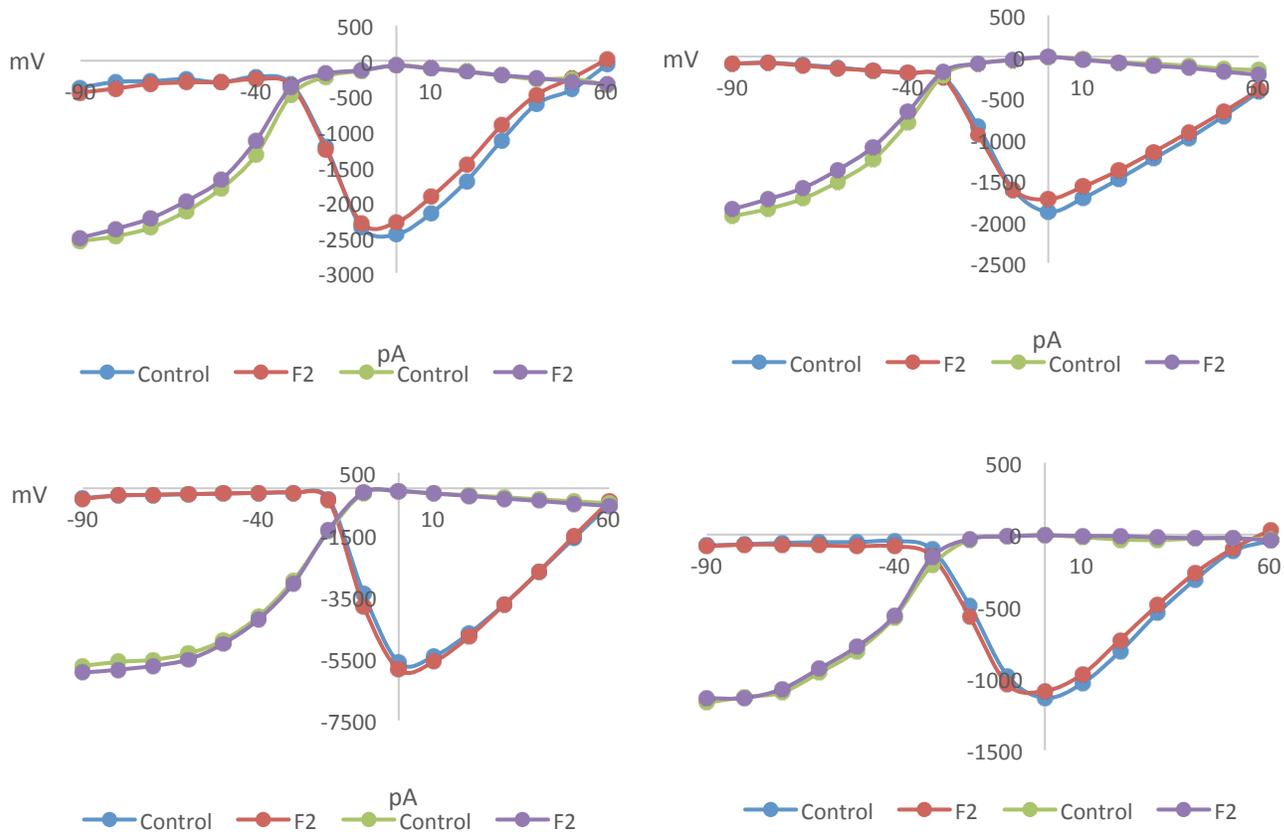
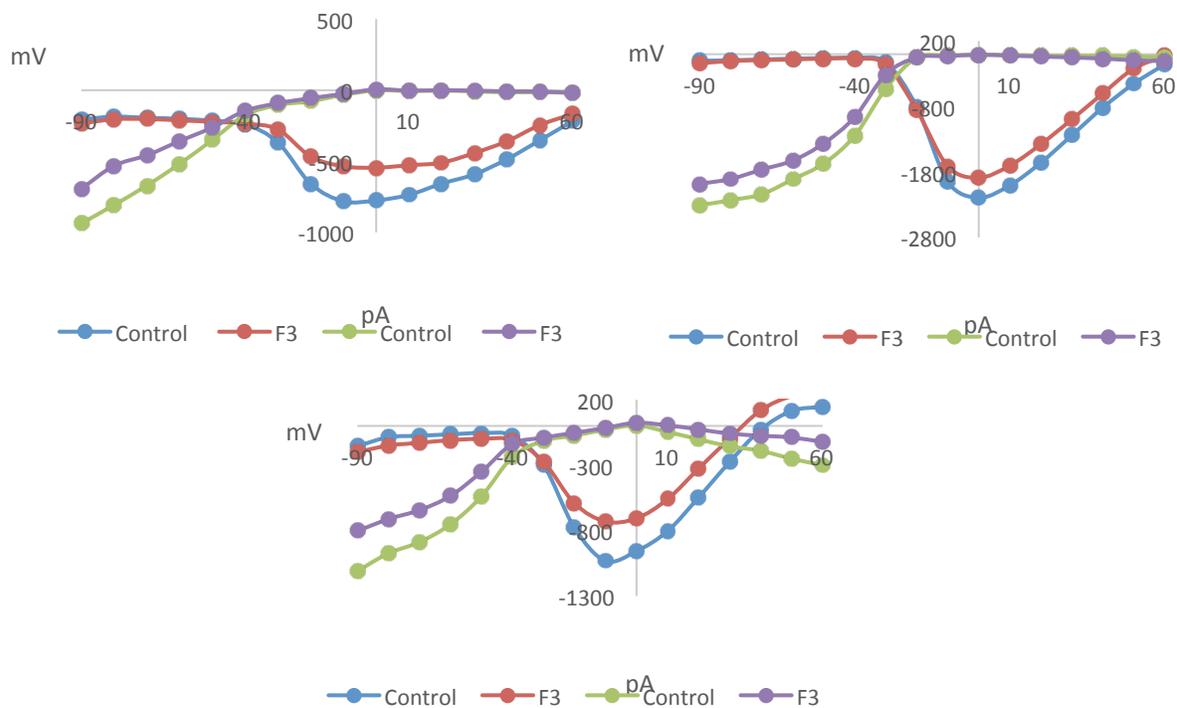


Figura B4.- Ensayos de cada célula probada con F2 1 $\mu$ M, cada una de las gráficas muestra la curva I-V de una célula distinta.



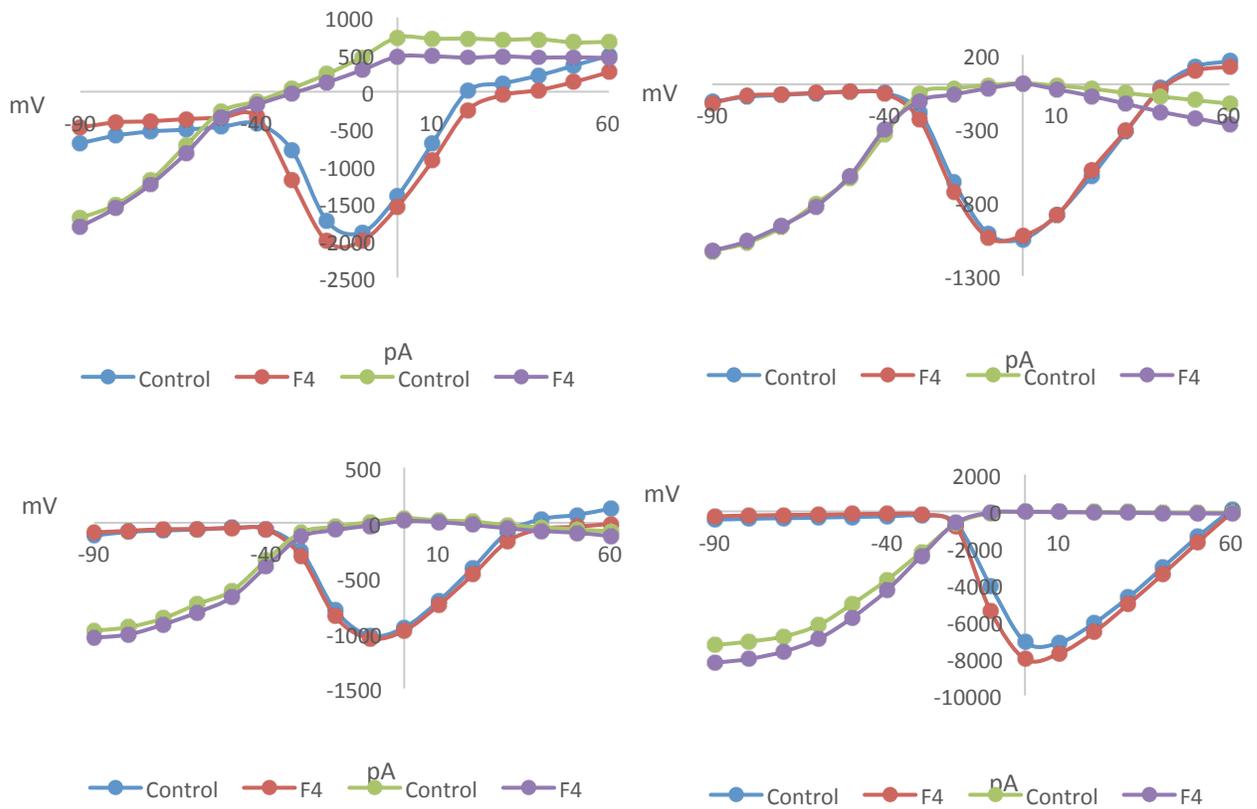


Figura B6.- Registros en presencia de F4 a 1  $\mu$ M. Cada gráfica representa curvas de activaci3n e inactivaci3n de una c3lula distinta.