



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Diseño de variantes de la β -neurotoxina rCsslI-RCR que modifiquen el reconocimiento del subtipo hNav1.6 al hNav1.7 con el fin de obtener un péptido con efecto antinociceptivo

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

M.C. PAVEL ANDREI MONTERO DOMÍNGUEZ

TUTOR:

Dr. Gerardo Corzo Burguete

Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Carmen Nina Pastor Colón

Centro de Investigación en Dinámica Celular

Dra. Georgina Estrada Tapia

Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Cuernavaca, Morelos. Enero del 2024



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.

A ustedes que leen esta tesis: la ciencia no es solo un conjunto de conocimientos, es una forma de pensamiento. Esta nos invita a ser escépticos y a cuestionar la veracidad de la percepción de nuestra realidad. Por ello, cuestionen la autoridad, ninguna idea es verdadera solo porque alguien más lo dice. Piensen por sí mismos y más importante aún, cuestionense a sí mismos. Somos la forma en que el universo se dio sentido así mismo para poder apreciarse. Por tanto, contemplemos de manera respetuosa y objetiva a nuestro cosmos.

Dedico esta tesis a mi abuelo el profesor Cinar Arístides Domínguez Molina, por acompañarme como mi padre y abuelo en este sendero llamado vida. A mi querido hijo Andre Javier Montero Ballinas que, a su corta edad y poco entendimiento del mundo, siempre estuvo al pendiente de mi existencia durante estos cuatro años. Este logro es gracias a ustedes, los amo con todo mi ser.

Agradecimientos

A la Dra. Melisa Benard, no solo acompañarme académicamente durante el doctorado, por ser una amiga increíble que me demostró determinación y convicción respecto a sus aspiraciones y ética profesional. Tienes un lugar especial MELI

Al Dr. Jesús Borrego, por ser mi mentor de laboratorio, por enseñarme a dominar casi el 100 % de las técnicas del laboratorio, ser profesional en todo sentido y por ser mi mentor los primeros semestres de mi formación como experimental.

A la Dra. Rita Restano, por darse el tiempo de ayudarme con la electrofisiología entre las miles de cosas que siempre tienes pendientes. Así como por escucharme y acompañarme académica y emocionalmente durante mi todo el doctorado.

Agradezco al Dr. Corzo por confiar en mí, un estudiante teórico de Ciencias Físicas con casi nulo conocimiento en experimentación *in vitro* e *in vivo* que entro con la idea de corroborar sus modelos computacionales.

Al Dr. Iván Arenas, por estar presente y compartir su tiempo conmigo una buena parte de este viaje de cuatro años.

Al Dr. Alejandro Alagón, porque sin siquiera conocerme me dio una segunda oportunidad al ayudarme con la intervención neuroquirúrgica a la que fui sometido.

Al Dr. Ramon Garduño Juárez por aceptarme como su estudiante en mi maestría y gracias a ello empezar mi viaje formal en el mundo de la ciencia.

A la Dra. Nina Pastor, por permitirme crecer académicamente en el área de la biología estructural computacional.

A los estudiantes del laboratorio 13 Alagón-Corzo, a Manuel el simio, Astrid Tuxpan, Andrea Colis y el Mike Mejía por los buenos momentos que atesorare en mi memoria.

Al turno nocturno, por hacer este final de mi camino agradable, principalmente por darme la oportunidad de conocerlos fuera del ambiente académico. A ti Alid (Acida, Hunter, Pastelito etc.) y Andrid (JR).

Agradecimientos especiales al espero pronto Maestro Alid Guadarrama, ha sido un placer conocerte como amigo en esta etapa final de mi viaje en el doctorado. Te agradezco tu honestidad y tu tiempo compartido.

A los autodidactas, y espero los próximos investigadores, al Dr. Daniel Alejandro (gato) y al Dr. Franco Urquijo (ocioso) por esas platicas “que solo el *team* autodidacta” se le ocurriría tener. Como diría Pablo la siguiente reunión será en Berlín.

A los perritos Hugo y Julito por esas buenas vivencias juntos durante nuestros estudios de posgrado. La palapa no se olvida de nosotros.

A la Ingeniera Genesis Natalie por ser una parte importantísima en mi historia de vida durante mi estancia acá en Cuernavaca, te quiero.

Al bueno amigo filosofo Jesús (Yeshua) por complementar parte de mi con tu intelecto y enseñanzas.

A Claire Riualen (Clarita) por tu amistad y compañía durante el doctorado, mi primera pareja de baile en Cuernavaca.

Agradezco a mi familia, la cual pese a sus diferencias tratan en la medida de lo posible de limar sus asperezas y permanecer unidos. A mi tía Gaby a mi Hermana Andrea mí y Madre Patricia.

A ti Cactus Jurásico, por llegar de manera inesperada en mi vida y renovar mi fe.

Nuevamente agradezco a mi tía Gaby por estar en uno de los episodios más importantes de mi vida como lo fue acompañarme en mi recuperación post operatoria. Siempre estaré en deuda contigo.

A mis estudiantes, que con todo cariño y esfuerzo trato de enseñarles lo poco que se sobre el funcionamiento de la naturaleza. Sean conscientes que el conocimiento es una responsabilidad y quieran o no ustedes son el futuro de este mundo.

A la madre de mi Hijo, la Dra. Mayela Montserrat Ballinas Ruiz. Por darme la oportunidad de cultivar una amistad y permitir que nuestro hijo crezca con el amor de sus dos padres independiente de nuestros caminos elegidos.

Nuevamente a mi abuelo (Cinar), a mi hermano (Gabriel) y a mi hijo (Andre). Los tres mosqueteros de mi vida son pilares de mi existencia y su presencia marco de manera positiva mi camino durante mis estudios de posgrado.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio 13 a cargo del Dr. Gerardo A. Corzo Burguete, en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología, con financiamiento de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM), número IT200321, y del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT) proyecto denominado PRONAH "Venenos y antivenenos", número 303045.

Finalmente, agradezco al consejo de ciencia y tecnología (CONAHCyT) por la beca de doctorado a nombre del estudiante Pavel Andrei Montero Domínguez con CVU: 775900. También al laboratorio nacional del cómputo de alto desempeño (LANCAD-UNAM-DGTIC) proyecto número 376.

Este trabajo resulto en la obtención de la patente (*en solicitud*):

Nuevas variantes de péptidos con actividad analgésica provenientes de neurotoxinas obtenidas mediante expresión heteróloga

Tabla de contenido

Agradecimientos.....	ii
Tabla de contenido	iv
Índice de figuras	vii
Índice de tablas	ix
Resumen.....	1
1 Introducción	3
2 Marco teórico	5
2.1 Canales iónicos y su importancia en la homeostasis celular	5
2.2 Canales de sodio dependientes de voltaje y su importancia médica.....	5
2.3 Canales de sodio dependientes de voltaje y su importancia en la nocicepción...	5
2.4 Topología y estructura de los canales de sodio dependientes de voltaje.....	6
2.5 Moléculas de animales ponzoñosos y su uso para el tratamiento de patologías.	8
2.6 Neurotoxinas de alacrán que afectan canales Nav.	9
2.7 Diseño racional de fármacos asistido por computadora.....	9
3 Antecedentes.	12
3.1 β -toxinas de alacrán del género <i>Centruroides</i>	12
3.2 Superficie activa de las β -toxinas de alacrán del género <i>Centruroides</i>	13
3.3 Mecanismo molecular de interacción β -neurotoxinas del género <i>Centruroides</i> .	14
3.4 Expresión heteróloga de β -neurotoxinas de alacrán del género <i>Centruroides</i> ..	15
3.5 β -neurotoxinas de alacrán del género <i>Centruroides</i> con actividad sobre Nav's relacionados a la nocicepción.....	16
4 Justificación	19
5 Hipótesis.....	21
6 Objetivos	21
6.1 Objetivo general	21
6.2 Objetivos específicos.....	21
7 Métodos	23
7.1 Métodos computacionales.....	25
7.1.1 Obtención de la estructura tridimensional de toxinas β -neurotoxinas.....	25
7.1.2 Obtención de la estructura tridimensional de hNav's.	25
7.1.3 Minimización de estructuras en vacío.....	25
7.1.4 Construcción de sistemas hNav's/membrana.	25
7.1.5 Minimización de estructuras sistemas.	26

7.1.6 Acoplamiento molecular.....	26
7.1.7 Simulaciones por dinámica molecular	27
7.2 Métodos experimentales	29
7.2.1 Separación del veneno de <i>Centruroides elegans</i>	29
7.2.2 Obtención de variantes peptídicas de CsslI-RCR	29
7.2.3 Expresión de variantes peptídicas.....	30
7.2.4 Purificación de variantes peptídicas por columna de afinidad a níquel	31
7.2.5 Reducción de péptidos de fusión.	31
7.2.6 Plegamiento de péptidos de fusión reducidos.	31
7.2.7 Espectroscopia de masas	31
7.2.8 Ensayos de toxicidad en ratones CD1: Administración intracraneal	31
7.2.9 Ensayos electrofisiológicos	32
7.2.10 Ensayos de nocicepción de variantes peptídicas.....	32
7.2.10.1 Ensayos de mecanocicepción de variantes de la HisrCsslI-RCR	32
7.2.10.2 Inducción de modelo de dolor inflamatorio	33
7.2.10.3 Inducción de modelo de dolor neuropático	33
7.2.10.4 Análisis de datos.....	33
8 Resultados y discusión.....	36
8.1 Resultados computacionales.....	36
8.1.1 Obtención de estructuras tridimensionales de β -neurotoxinas.	36
8.1.2 Análisis estructural de los sDSV del canal hNav1.7	38
8.1.3 Modelado molecular del canal hNav1.6.....	39
8.1.4 Dinámica molecular del canal hNav1.6.....	40
8.1.5 Análisis de la superficie electrostática de β -neurotoxinas y canales Nav's.	41
8.1.6 Acoplamiento molecular de β -neurotoxinas sobre el sitio 4 de Nav1.6.....	44
8.1.7 Modelo de interacción por dinámica molecular de β -neurotoxinas sobre el sitio 4 de Nav1.6.....	44
8.1.8 Atrapamiento del sensor de voltaje	49
8.2 Resultados experimentales	51
8.2.1 Purificación de Cell8 del veneno del alacrán <i>Centruroides elegans</i>	51
8.2.2 Purificación de Cell8 del veneno de fracciones de intercambio iónico	52
8.2.3 Ensayos de electrofisiología de la toxina Cell8 purificada del veneno de <i>C. elegans</i>	53
8.2.4 Diseño de variantes peptídicas de rCsslI-RCR	53
8.2.5 Producción de variantes peptídicas del péptido HisrCsslI-RCR	54

8.2.6 Prueba de toxicidad de variantes peptídicas de rCsslI-RCR en modelo murino	57
8.2.7 Ensayos de electrofisiología para variantes de rCsslI-RCR	59
8.2.8 Ensayos de mecanocicepción para las variantes de rCsslI-RCR	61
8.2.9 Potencial y alcances de la variante HisrCsslI-Del-D23A-TCD: Modelos de Dolor Inflamatorio y Neuropático.....	63
9 Conclusiones	67
10 Prospectivas.....	69
11 Referencias.....	71
12 Anexos.....	77
Anexo I. Composición lipídica de membrana compleja	77
Anexo II. Oligos mutagénicos para producción de variantes peptídicas de HisrCsslI-RCR	78
Anexo III. Interacciones moleculares para los complejos toxina/receptor.....	79
Anexo IV. Rendimiento de las variantes peptídicas de HisrCsslI-RCR	81
Anexo V. Artículo publicado.....	82
Anexo VI. Patente en proceso de publicación.....	91

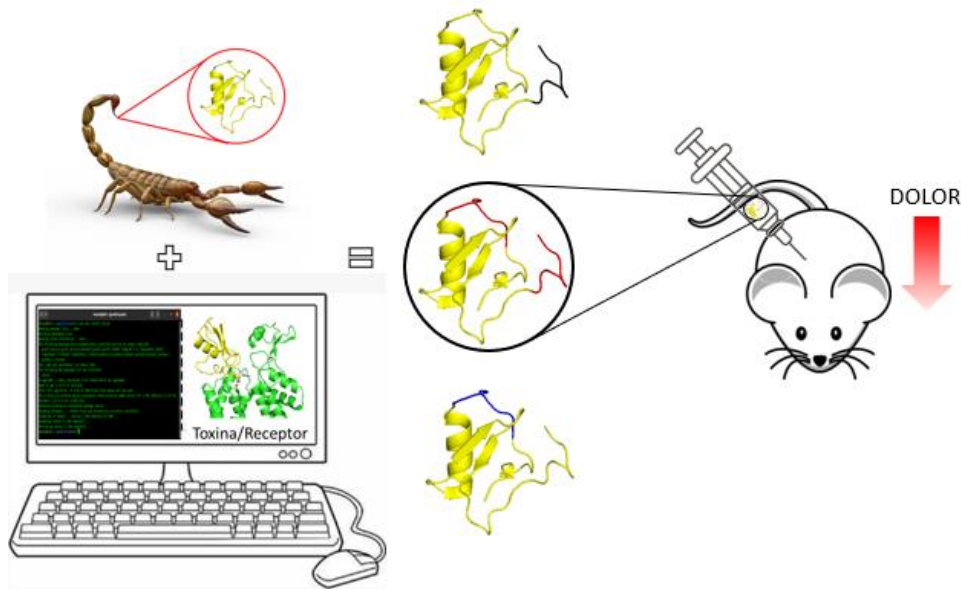
Índice de figuras

Figura 1. Topología general de la subunidad α de los Nav's.....	7
Figura 2. Estructura tridimensional, efecto electrofisiológico y mecanismo de atrapamiento de sensor de voltaje de β -neurotoxinas.....	12
Figura 3. Alineamiento de secuencia de β -neurotoxinas del género <i>Centruroides</i> con superficie activa coloreada según su zona.....	13
Figura 4. Modelos de interacción de β -neurotoxinas de alacrán sobre canales Nav's.....	14
Figura 5. Estructura tridimensional y alineamiento de secuencia de péptidos recombinantes de la β -neurotoxina nCssl.....	16
Figura 6. Efecto electrofisiológico, estructura tridimensional y secuencia de la β -neurotoxinas Cell8.....	17
Figura 7. Diagrama metodológico general del proyecto.....	23
Figura 8. Sitio 4 de unión de β -toxinas de alacrán	26
Figura 9. Descripción de la configuración de primers utilizados en la PCR mutagénica....	29
Figura 10. Ensayos electrofisiológicos en canales Nav.....	32
Figura 11. Alineamiento estructural de β -neurotoxinas de alacrán del género <i>Centruroides</i>	36
Figura 12. Estructuras tridimensionales y alineamiento de secuencias pertenecientes a β -neurotoxinas de alacrán del género <i>Centruroides</i>	37
Figura 13. Disposición de cargas de apertura (CA) del sensor de voltaje (S4) respecto el centro de transferencia de carga (CTC) del segmento dos (S2) de los sDSV-II de diferentes canales Nav.....	39
Figura 14. Modelado molecular del canal hNav1.6.....	39
Figura 15. Sitio 4 de unión a β -neurotoxinas del canal hNav1.6.....	40
Figura 16. Distintas configuraciones simuladas proteína/membrana para el canal hNav1.6.....	40
Figura 17. Matriz de alineamiento de estructuras representativas del sitio 4 del hNav1.6 en los sistemas proteína/membrana simulados.....	41
Figura 18. RMSD de cadena principal con respecto al tiempo para todos los sistemas simulados.....	41
Figura 19. Estructuras y mapas de potencial electrostático para β -neurotoxinas del género <i>Centruroides</i> y el sitio 4 del canal hNav1.6.....	42
Figura 20. Estructuras y mapas de potencial electrostático para la β -neurotoxina del género <i>Centruroides</i> Cell8 y el sitio 4 del canal hNav1.7.....	43
Figura 21. Acoplamientos moleculares para β -neurotoxinas de alacrán del género <i>Centruroides</i> sobre el sitio 4 del canal hNav1.6.....	44
Figura 22. Acoplamiento molecular de las toxinas nCssl y rCssl-RCR.....	45

Figura 23. Modos de interacción por parte de las β -neurotoxinas nCsslI y rCsslI-RCR sobre el sitio 4 del canal hNav1.6.....	46
Figura 24. Interacciones salinas por parte de las β -neurotoxinas nCsslI y rCsslI-RCR sobre el sitio 4 del canal hNav1.6.....	48
Figura 25. Cromatograma de purificación del veneno de <i>C. elegans</i>	51
Figura 26. Cromatogramas de repurificación del veneno de <i>C. elegans</i>	52
Figura 27. Efecto de toxinas sobre curvas de corriente I/V de la isoforma del canal hNav1.7.....	53
Figura 28. Mapas de potencial electrostático y estructura tridimensional de β -neurotoxinas y sitio 4 de los hNav1.6 y hNav1.7.....	54
Figura 29. Geles de acrilamida al 15% para la purificación de las variantes.....	55
Figura 30. Cromatogramas de reducción y plegamiento de variantes peptídicas I.....	56
Figura 31. Cromatogramas de reducción y plegamiento de variantes peptídicas II.....	57
Figura 32. Efecto de las variantes peptídicas de HisrCsslI-RCR sobre las isoformas del hNav1.6 y hNav1.7-I.....	59
Figura 33. Efecto de las variantes peptídicas de HisrCsslI-RCR sobre las isoformas del hNav1.6 y hNav1.7-I	60
Figura 34. Pruebas de mecanocicepción de variantes peptídicas de rCsslI-RCR.....	61
Figura 35. Pruebas de mecanocicepción para la variante peptídica rCsslI-Del-D23A-TCD.....	64
Figura 36. Diagrama metodológico propuesto para optimización de péptidos.....	69

Índice de tablas

Tabla 1. Expresión tisular de canales de sodio dependientes de voltaje y patologías asociadas.....	6
Tabla 2. Medicamentos basados en toxinas de animales ponzoñosos aprobados para uso humano.....	8
Tabla 3. Toxinas de alacrán obtenidas mediante expresión heteróloga (rScTx).....	15
Tabla 4. Secuencia de variantes peptídica de HisrCsslI-RCR.....	30
Tabla 5. Reacción de PCR mutagénica.....	30
Tabla 6. Condiciones de amplificación de PCR mutagénica.....	30
Tabla 7. Pesos moleculares para variantes peptídicas de HisrCsslI-RCR.....	56
Tabla 8. Efecto de variantes peptídicas de HisrCsslI-RCR en modelo murino.....	58



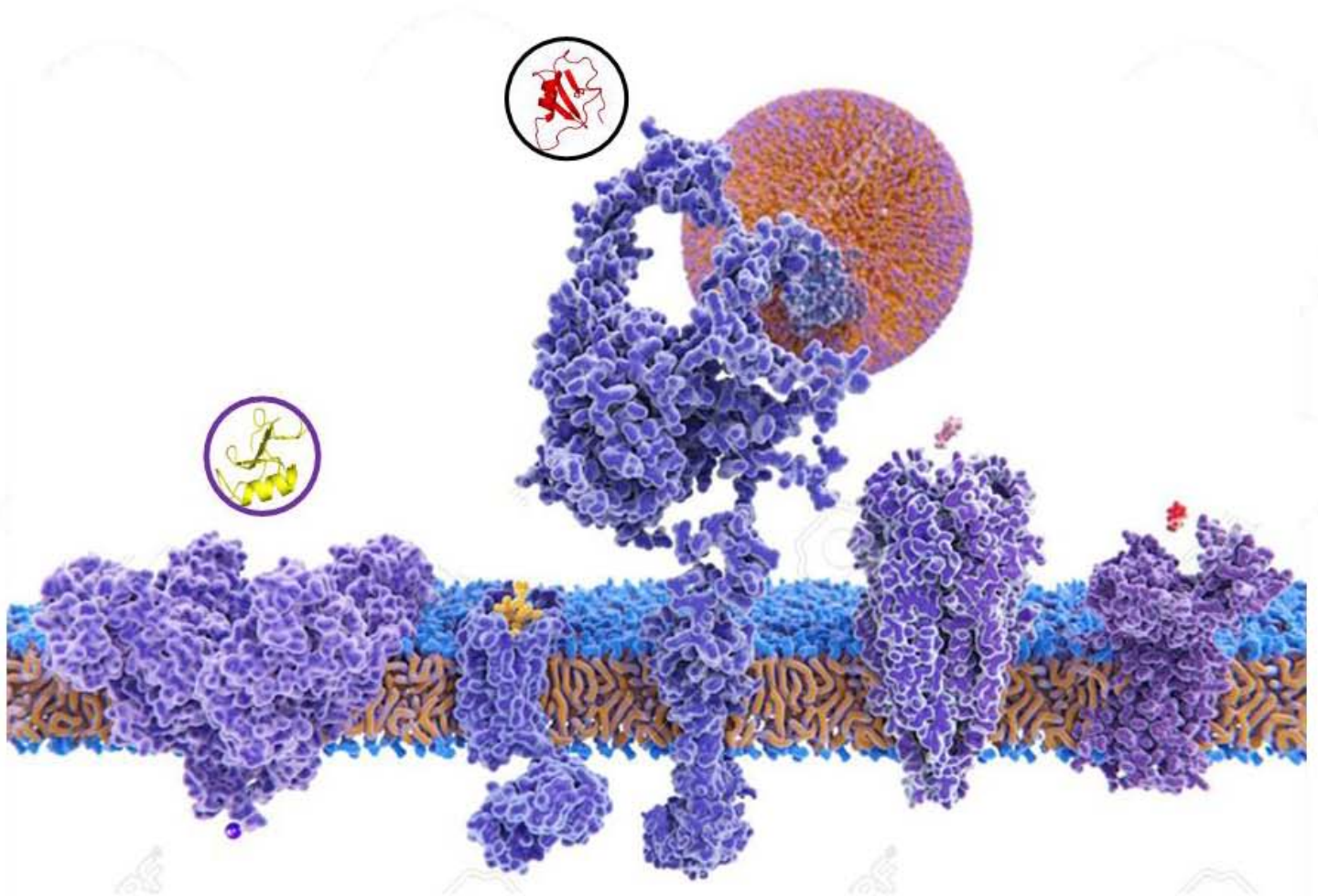
(Resumen gráfico)

Resumen

En este estudio, a través de técnicas de biología estructural computacional, se dilucidó el mecanismo de unión por parte de dos β -neurotoxinas de alacrán del género *Centruroides* sobre el canal humano de sodio dependiente de voltaje del subtipo 1.6 (hNav1.6). La información obtenida a través de simulaciones por dinámica molecular permitió determinar zonas de relevancia en la interacción por parte de las toxinas nCsslI y rCsslI-RCR con el canal hNav1.6. Estas regiones relevantes, por parte de ambas toxinas, se localizaron en el N y C-terminal, permitiendo correlacionar estas secciones de unión con los residuos localizados en la toxina de importancia médica Cell8. Este péptido es la única β -neurotoxina, del género *Centruroides*, con la capacidad de interactuar con el canal relacionado al procesamiento y transmisión de estímulos dolorosos (nocicepción), el hNav1.7. Debido a esto, a través del uso de técnicas de mutagénesis sitio dirigida y expresión heteróloga, se obtuvieron variantes de la toxina HisrCsslI-RCR con la capacidad de modular el canal hNav1.7. Siendo estos péptidos inspirados en la información estructural generada por nuestros modelos descritos anteriormente. Se observó que dos variantes peptídicas, HisrCsslI-Del-D23A-RCR y HisrCsslI-Del-D23A-TCD, presentaron actividad sobre el canal hNav1.7, resaltando al péptido HisrCsslI-Del-D23A-TCD como la única variante que previno los signos de intoxicación en el modelo murino. Esta variante mostró la actividad de alterar la percepción del dolor (efecto antinociceptivo) en ratones sanos, así como en un modelo de dolor inflamatorio y neuropático. Observando un efecto equiparable, por parte del péptido HisrCsslI-Del-D23A-TCD, respecto a un control positivo de analgesia en cada modelo probado.

Este proyecto contribuye significativamente al conocimiento de los mecanismos moleculares de interacción por parte de las β -neurotoxinas de alacrán del género *Centruroides* sobre los Nav's. Por otro lado, resalta la importancia de conocer el detalle atómico del modo de unión de estas toxinas para el desarrollo racional de productos biotecnológicos con actividad sobre blancos relacionados a la nocicepción.

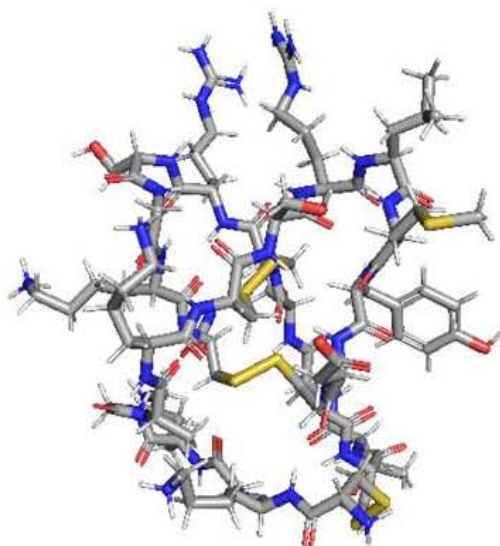
INTRODUCCIÓN



1 Introducción

Los canales iónicos dependientes de voltaje son proteínas transmembranales por donde se difunden iones de manera selectiva, teniendo la habilidad de activarse a través de detectar el cambio del potencial eléctrico en la membrana plasmática. Estos canales son claves para el mantenimiento de diversas funciones celulares, siendo el mal funcionamiento de estas proteínas correlacionado con un gran número de canalopatías, y por tanto, con el desarrollo de diferentes enfermedades. Debido a esto, la modulación de estos complejos, como son los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav's), es de vital relevancia para el tratamiento de diferentes patologías [1,2]. Una alternativa en la búsqueda de moléculas con actividad sobre los canales de Nav's se presenta en las neurotoxinas pertenecientes a los venenos de animales ponzoñosos, como es el caso de los alacranes. Estos animales presentan diferentes sustancias, principalmente de naturaleza proteica, con la capacidad de alterar la cinética de activación de estos canales [3]. Particularmente las β -neurotoxinas de alacrán son péptidos de entre 60 a 80 aminoácidos que presentan una amidación en el C-terminal, exhibiendo un arreglo tridimensional tipo $\beta\alpha\beta\beta$ estabilizado por 4 puentes disulfuro. Estas β -toxinas interactúan con el sitio 4 de los canales Nav's, ocasionando la reducción del pico de la corriente máxima y el corrimiento de la curva de activación a potenciales más negativos, esto último, a través de un mecanismo conocido como atrapamiento del sensor de voltaje [4,5]. Sin embargo, aunque existe suficiente información sobre los efectos electrofisiológicos causados por la interacción de estos péptidos, los detalles atomistas por el cual se lleva a cabo la unión (toxina/receptor) sigue siendo un misterio. Por otro lado, a pesar de que las β -neurotoxinas presentan promiscuidad por diferentes isoformas de los Nav's, la gran mayoría de estas toxinas no interactúan con canales relacionadas al dolor como son los Nav1.3, Nav1.7, Nav1.8 y Nav1.9 [6–8]. La toxina nCsslI es una β -neurotoxina de importancia médica perteneciente al alacrán *Centruroides suffusus suffusus*, la cual, exhibe la capacidad de modificar la cinética de activación del hNav1.6 [9]. En el 2007 Estrada y colaboradores obtuvieron la toxina CsslI de manera recombinante (rCsslI), sin embargo, se observó que la afinidad por parte de este péptido fue 15 veces menor al de la toxina nativa [10]. Debido a que la única diferencia existente entre ambos péptidos fue la amidación del C-terminal, Estrada y colaboradores en el 2011 evaluaron el efecto de agregar cargas positivas a la región del C-terminal, obteniendo a la variante rCsslI-T64R/N66R (rCsslI-RCR). Este péptido recombinante, rCsslI-RCR, recuperó la afinidad de manera equiparable con la toxina nativa CsslI, enfatizando la importancia de la carga en el extremo C-terminal para el funcionamiento de estas toxinas [11]. En el 2010 Vandendriessche y colaboradores purificaron la primera y única toxina de alacrán con efecto β —Cell8— con la capacidad de interactuar con la isoforma del canal hNav1.7 [12]. Este péptido, presenta características únicas a nivel secuencia primaria en contraste con todas las β -neurotoxinas reportadas en la literatura. Entre estas diferencias se aprecia la ausencia de amidación en el C-terminal, la presencia de un residuo con carga negativa al final de su secuencia, una doble carga negativa localizada en el N-terminal, así como la presencia de dos deleciones en comparación con la toxina nCsslI. Debido a esto, en este estudio se logró, a partir del uso de técnicas *in silico*, develar regiones importantes involucradas en la unión de las β -neurotoxinas con sus respectivos blancos moleculares. Permitiendo con esto inferir regiones importantes en secuencia en el péptido Cell8 para su mimetización en la toxina rCsslI-RCR. Esto último con el objetivo de generar variantes peptídicas con la capacidad de interactuar con la isoforma de importancia médica del hNav1.7 y con ello generar una molécula con actividad antinociceptiva.

MARCO TEORICO



Ω -Conotoxina



2 Marco teórico

2.1 Canales iónicos y su importancia en la homeostasis celular

Los canales iónicos son proteínas transmembranales que permiten el paso selectivo de iones a través de la membrana celular, desempeñando roles esenciales en la fisiología de todas las células. La actividad de los canales iónicos está controlada por diferentes factores como el potencial de membrana, la unión a ligandos, el pH, la temperatura, la fuerza mecánica entre otros [13]. Los canales iónicos permiten a las células percibir y responder a estímulos extracelulares e intracelulares, siendo de gran importancia para la realización de diversas funciones celulares. Actualmente se conoce la relación existente entre los canales iónicos con la aparición y desarrollo de diversas enfermedades, siendo las enfermedades que se desarrollan debido a defectos en los canales iónicos denominadas canalopatías. Debido al importante papel en la fisiología celular de estas proteínas, la comprensión del funcionamiento de los canales es importante para el desarrollo de diferentes terapias [14,15].

2.2 Canales de sodio dependientes de voltaje y su importancia médica.

Los canales de sodio dependiente de voltaje (Nav's) son complejos moleculares cuya capacidad de activación es dependiente del voltaje exhibido en la membrana celular. Existen diferentes tipos de Nav's, llamadas isoformas, las cuales presentan particulares cinéticas de activación según su tipo. Estas isoformas se clasifican del canal Nav1.1 hasta el Nav1.9 y se encuentran localizadas en diferentes tejidos como lo es el músculo esquelético (ME), músculo cardíaco (MC), raíz de ganglios dorsales (RGD), sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP) (Ver tabla 1). A pesar de que la abundancia de una o más isoformas de Nav's depende del tipo de tejido, la RGD es la única que exhibe la presencia de todas las isoformas de los canales en mamíferos [15,16]. Ya que la expresión diferencial de los canales Nav's está vinculada a un cierto órgano o sistema en particular, el incorrecto funcionamiento de estas proteínas se correlaciona con el desarrollo de patologías asociadas a su tejido de expresión (Ver tabla 1). Debido al importante papel que implica la modulación de los canales de Nav's en el tratamiento de diferentes patologías, estas proteínas han sido motivo de estudio para el desarrollo de diferentes tratamientos. Siendo el caso de la Lidocaína y la Remacemida fármacos utilizados para el control afecciones asociadas a los Nav's como el dolor y el Parkinson respectivamente [17].

2.3 Canales de sodio dependientes de voltaje y su importancia en la nocicepción.

A pesar de que cada Nav's está asociada a particulares funciones celulares, únicamente ciertas isoformas están involucradas en la traducción, transmisión y codificación de estímulos dolorosos a impulsos eléctricos. Este fenómeno de transmisión de la información eléctrica de los receptores del dolor (nociceptores) en el SNP al SNC es conocido como nocicepción [7,8]. Debido a esto, las isoformas relacionadas a la transmisión de señales dolorosas, como lo son los Nav1.3, Nav1.7, Nav1.8 y Nav1.9, se encuentran principalmente distribuidas en el SNC y SNP. Siendo la RGD, considerado como un tejido importante para la comunicación del SNP y el SNC, es un lugar donde se localizan todas las isoformas de los canales de Nav's [15,16]. Dado el importante papel que presentan algunos canales Nav's en la nocicepción, estas proteínas han sido utilizadas como dianas farmacológicas, para el desarrollo de agentes

terapéuticos para el tratamiento de patologías asociadas al dolor. El principal mecanismo de acción, por el cual estas moléculas analgésicas actúan, es a través de la interrupción de la información eléctrica entre el SNP al SNC. A pesar de que existen diferentes mecanismos moleculares para alterar la nocicepción, la reducción parcial o total de la corriente iónica de los canales Nav's es una de las principales vías para generar un efecto analgésico. Siendo este el caso del fármaco Lidocaína, el cual produce anestesia local a través del bloqueo de los canales Nav1.7 y Nav1.8 [18–22].

Tabla 1. Expresión tisular de canales de sodio dependientes de voltaje y patologías asociadas.

Isoforma	Tejido de expresión	Patologías asociadas a su mal funcionamiento
Nav1.1	SNC, SNP, MC y RGD	MSIE, SD, Autismo, EGCF
Nav1.2	SNC, SNP y RGD	CNIFB, SD, Autismo, EGCF, SO
Nav1.3	SNC, SNP, MC y RGD	No claro
Nav1.4	ME, MC y RGD	MAP, PC, PPHiper, PPHipo
Nav1.5	ME, MC, SNC y RGD	FA, PA, SB, CD, ECCP, MSIE
Nav1.6	MC, SNC, SNP y RGD	EEIT, Parálisis, Ataxia, Distonía, Deterioro cognitivo
Nav1.7	SNP y RGD	IDAC, EH, TDEP, NPD
Nav1.8	RGD	NPD
Nav 1.9	SNP y RGD	NPD

SNC: Sistema nervioso central; SNP: Sistema nervioso periférico; ME: Musculo esquelético; MC: Musculo cardiaco; RGD: Raíz de Ganglios Dorsales; MSIE: Muerte subida inexplicable en epilepsia; SD: Síndrome de Dravet; EGCF: Epilepsia genética con convulsiones febriles; CNIFB: Convulsiones neonatales infantiles familiares benignas; SO: Síndrome de Ohtahara; MAP: Miotinía agravada por potasio; PC: Paramiotonía congénita; PPHiper: Parálisis periódica hiperpotasémica; PPHipo: Parálisis periódica hipopotasémica.; FA: Fibrilaciones atriales; PA: Parada atrial; SB: Síndrome de Brugada; CD: Cardiomiopatía dilatada; ECCP: Enfermedad de conducción cardíaca progresiva; EEIT: Encefalopatía epiléptica de inicio temprano; IDAC: Insensibilidad al dolor asociado a canalopatías; EH: Eritromelagia heredada, TDEP: Trastorno de dolor extremo paroxístico; NPD: Neuropatías periféricas dolorosas. *Tomado y modificado de Kruger y Isom en el 2016 [16]*

2.4 Topología y estructura de los canales de sodio dependientes de voltaje.

Los canales de sodio dependiente de voltaje (Nav's) son proteínas de membrana expresadas esencialmente por un único gen, este es suficiente para producir una unidad conductora y funcional denominada como subunidad α . Esta subunidad tiene un arreglo tridimensional simétrico el cual puede dividirse espacialmente en cuatro dominios, los cuales se enumeran en números romanos del I al IV. Así mismo, cada dominio está conformado por seis hélices α , conocidas como segmentos transmembranales, que se enumeran del segmento uno (S1) hasta el seis (S6). Siendo estos segmentos conectados mediante asas conectores localizadas en medio intracelular y extracelular (Ver figura 1A y 1B). Por otro lado, cada uno de estos dominios se pueden dividir en dos subdominios, comprendiendo del S1 al S4 como el subdominio sensor el voltaje (sDSV) y del S5 al S6 como el subdominio formador del poro conductor del canal (sDFP) (Ver figura 1A y 1B). Uno de los elementos clave que permite a estos canales activarse de manera dependiente del potencial de la membrana se ubica en los sDSV de cada dominio (I-IV), siendo este componente primordial un segmento sensible al voltaje membranal (S4). Este segmento conocido como sensor de voltaje exhibe residuos catiónicos (ARG/LYS), denominadas cargas de apertura (CA), cada 3 posiciones en secuencia. Siendo estos residuos cargados los encargados de orientar hacia el medio extracelular al S4, permitiendo mover las regiones conectoras S4-S5 de cada dominio.

Como consecuencia, el movimiento de las regiones intracelulares S4-S5, localizadas cerca de la compuerta intracelular del canal, desencadena la apertura del poro, posibilitando la conducción de iones sodio hacia el interior de la célula [23,24]. Posterior a la apertura, la conducción iónica es interrumpida a través de un proceso conocido como inactivación, siendo esta inducida por un cambio conformacional generado por un motivo aminoacídico, conservado en todos los Nav's. Este motivo denominado IFM (ILE-PHE-MET), localizado en la región conectora (asas intracelular) S6(DIII)-SI(DIV), permite modificar la geometría intracelular del poro, causando el bloqueo del flujo de iones a través del canal (Ver figura 1A) [25,26].

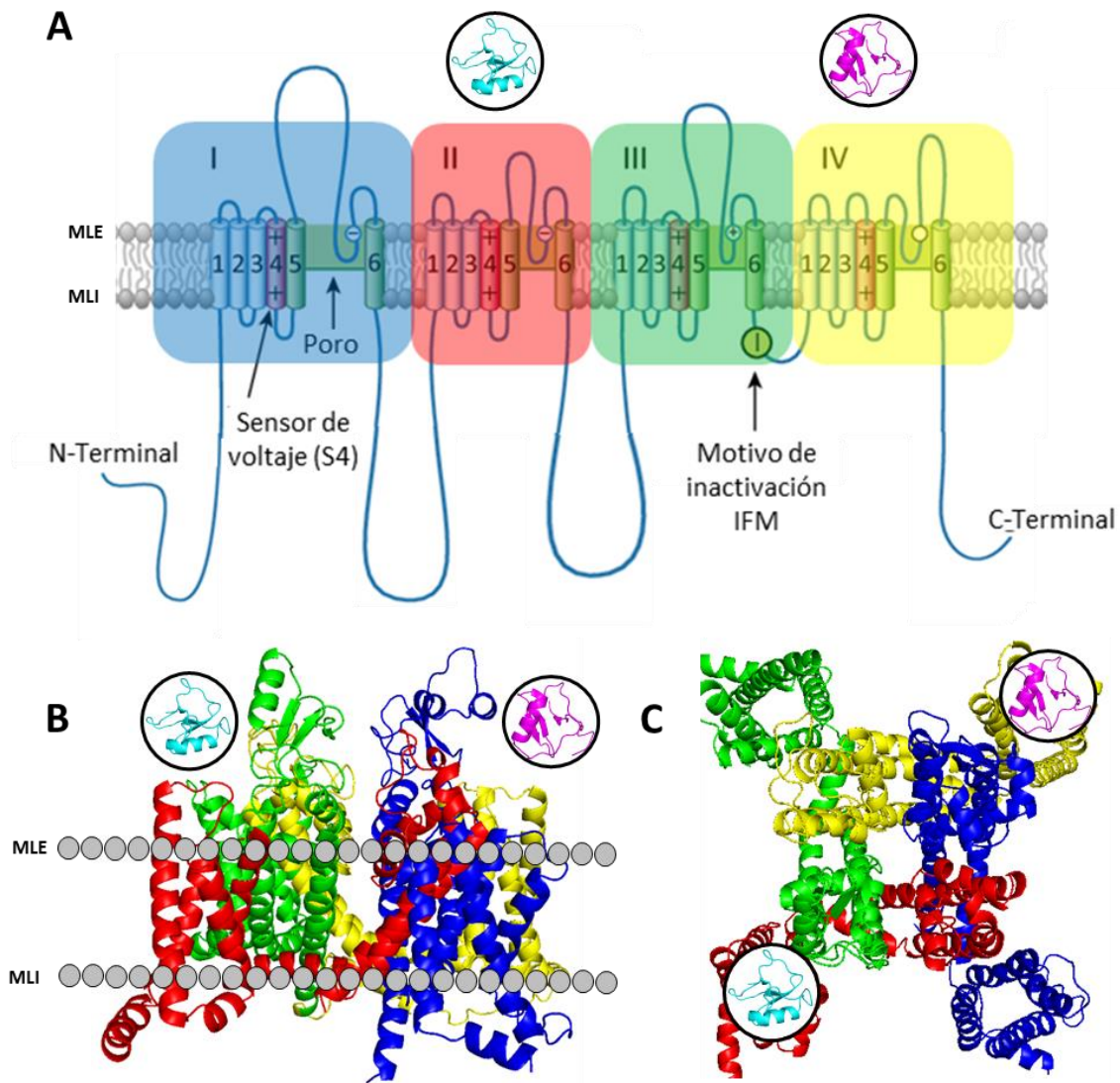


Figura 1. Topología general de la subunidad α de los Nav's. Topología bidimensional de la subunidad α de los Nav's (A) Estructura tridimensional de la subunidad α de los canales Nav's vista lateral (B) y superficial (C) a la membrana plasmática (Nav1.2 PDB ID: 6J8E). Sitio de unión neurotoxinas de alacrán representadas con toxinas encerradas en círculos negros, cian para β -neurotoxinas y magenta para α -neurotoxinas. Dominios representados en números romanos (I-IV) y coloreados según su localización en el diagrama bidimensional, así como en la estructura tridimensional. Esferas grises representan los grupos fosfatos de la bicapa lipídica. MLE: Monocapa lipídica externa. MLI: Monocapa lipídica interna.

2.5 Moléculas de animales ponzoñosos y su uso para el tratamiento de patologías.

Una alternativa a la búsqueda y desarrollo de moléculas con potencial terapéutico se puede encontrar en los venenos de animales ponzoñosos. Estas especies venenosas presentan una gran cantidad de sustancias, mayoritariamente de origen proteico, que modulan o bloquean ciertos fenómenos celulares a través de mecanismos químicos, como lo son los enzimáticos, o de interacción física con su receptor. Actualmente existen diferentes fármacos basados en las toxinas de estos animales como lo es el caso de Vivostat®, la cual proviene de la serpiente *Bothrops moojeni*. Esta enzima proteolítica, conocida como Batroxobina, exhibe la capacidad de romper las cadenas de α -fibrinógeno, lo que le permite funcionar como sellador de fibrina en cirugías. Por otro lado, también existen medicamentos no enzimáticos como lo es el Byetta® (Exenatida) y Prialt® (Ziconotide), estos últimos, provenientes del monstruo de Gila *Heloderma suspectum* y caracol *Conus magus* respectivamente. Estas moléculas antagonizan proteínas relacionadas a afecciones como lo es la diabetes mellitus, para el caso de la Exenatida, y el dolor crónico severo, para el caso de Ziconotide. Siendo este último fármaco un potente analgésico con un efecto mil veces más potente que la morfina a través del bloqueo de la corriente iónica de los canales de calcio dependientes de voltaje (Ver tabla 2) [27].

Tabla 2. Medicamentos basados en toxinas de animales ponzoñosos aprobados para uso humano

Fármaco	Molécula inspirada en toxina	Especie de origen de la toxina	Uso terapéutico	Mecanismo de acción
Vivostat®	Batroxobina	Serpiente brasileña punta de lanza (<i>Bothrops moojeni</i>)	Sellador de fibrina en cirugía	Ruptura de cadenas de α -fibrinógeno
Capoten®	Captopril	Serpiente de pozo de jacarandá (<i>Bothrops jacaranda</i>)	Hipertensión y falla cardíaca	Inhibidor enzimático de la angiotensina
Apitox®	Veneno de abeja	Abeja (<i>Apis mellifera</i>)	Dolor asociado a la osteoartritis	Alteración de la respuesta inmune a través de la competencia antigénica
Angiomax®	Bivalirudina	Sanguijuela medicinal europea (<i>Hirudo medicinalis</i>)	Anticoagulante en intervención coronaria	Inhibidor directo de trombina
Ketongning	Cobratida	Cobra china (Naja nada atra)	Artralgia crónica, y ciática	Bloqueo de los receptores nicotínicos
Byetta®	Exenatida	Monstruo de Gila (<i>Heloderma suspectum</i>)	Diabetes mellitus tipo 2	Agonista del receptor del péptido 1 similar al glucagón
Prialt®	Ziconotide	Caracol marino cono mágico (<i>Conus magus</i>)	Dolor crónico severo	Antagonista del canal Cav2.2

Tomado y modificado de Bordon y colaboradores en el 2020 [27].

2.6 Neurotoxinas de alacrán que afectan canales Nav.

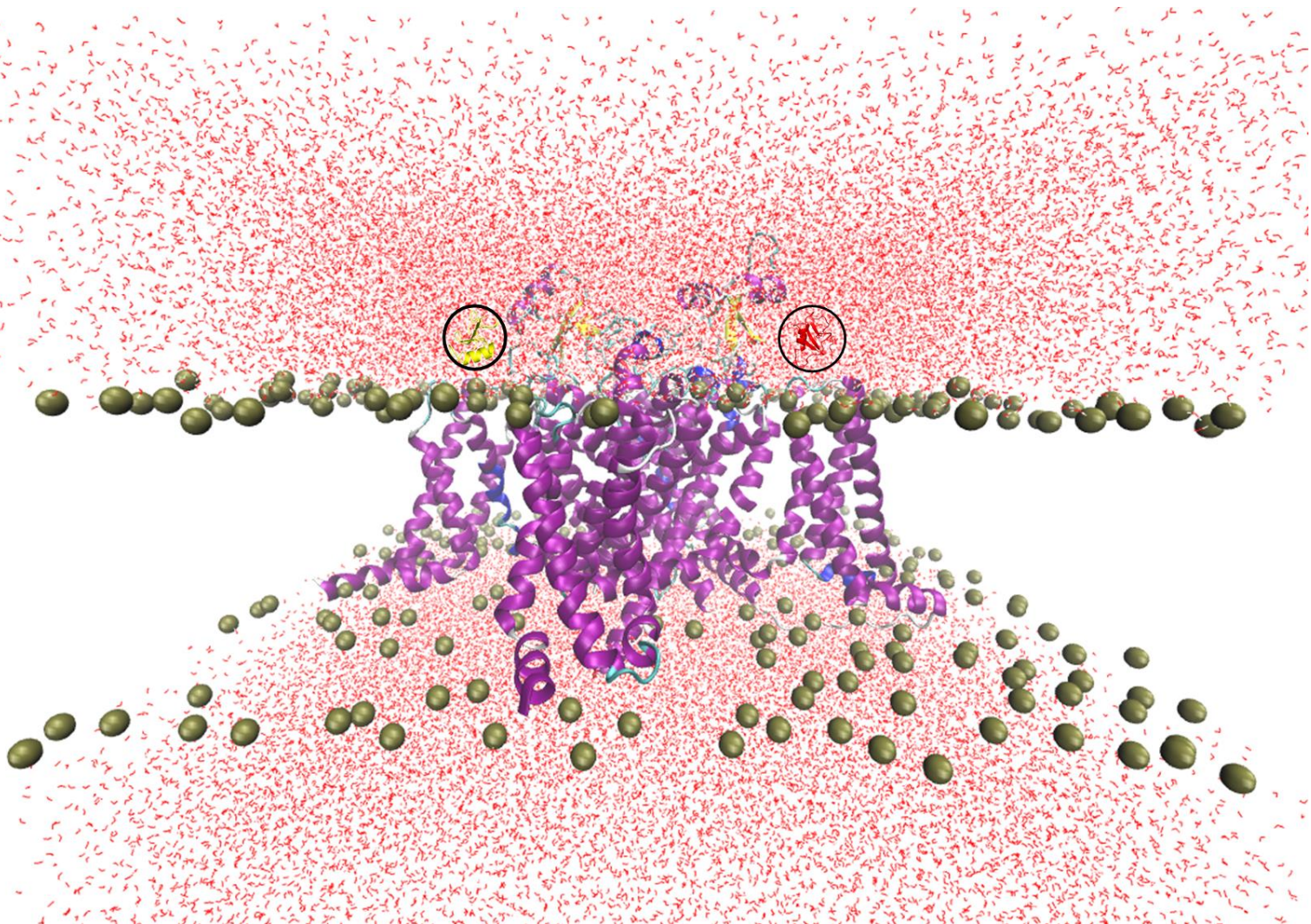
Los venenos de alacrán contienen una mezcla compleja de moléculas que afectan el sistema nervioso (neurotoxinas), traduciéndose la interacción de estas toxinas, con los canales de iónicos, en la alteración de la información eléctrica celular. Resultando esta alteración de la corriente iónica en la generación de efectos tóxicos o letales según el organismo. Aunque existe una amplia variedad de neurotoxinas de alacrán, aquellas que interactúan con los canales de Nav's presentan un tamaño aproximado de entre 60 a 80 aminoácidos. Estas exhiben un arreglo tridimensional del tipo $\beta\alpha\beta\beta$ estabilizado por cuatro puentes disulfuro, (Ver figura 2A) [28]. Así mismo las neurotoxinas de escorpio pueden ser clasificadas según el efecto generado, sobre la corriente y la cinética de activación de los canales de Nav's, siendo esta clasificación dividida en α - o β -toxinas. Por un lado, las α -toxinas alentan el proceso de inactivación rápida, prolongando los potenciales de acción en la célula al interactuar con en el sitio 3. Este sitio de unión está compuesto por el asa conectora extracelular S3-S4 del sDSV-IV, y en el asa S5-S6 del sDFP-I (Ver figura 1) [29]. Por otro lado, las β -toxinas se unen al sitio 4 formado por las asas conectoras S1-S2 y S3-S4 del sDSV-II, así como el dominio extracelular S5-S6 del sDFP-III (Ver figura 1). Esta unión, por parte de las β -toxinas, reduce el pico de corriente máxima y mueve la voltaje-dependencia de activación del canal a valores más negativos [28]. Este proceso de modificar la voltaje dependencia de activación de los Nav's, por parte de estas toxinas, tienen como consecuencia graves efectos fisiológicos como alteraciones cardíacas, parálisis y dificultad respiratoria. Siendo este efecto de alterar la dinámica de activación de estos canales la causa de la actividad tóxica y letal que presentan estas proteínas sobre los organismos como es el caso de mamíferos [4,29,30].

2.7 Diseño racional de fármacos asistido por computadora.

El diseño racional de fármacos es un área de investigación crucial en la búsqueda de moléculas para el tratamiento de diferentes patologías. Esta disciplina utiliza un profundo conocimiento de la estructura y función de las proteínas con el fin de diseñar componentes terapéuticos que interactúen de manera precisa con blancos biológicos específicos. Para ello, la estructura tridimensional de las proteínas es primordial para inferir información importante sobre los sitios de unión o interacciones de un receptor o ligando de interés [31]. A pesar de existir diferentes técnicas para la determinación de la estructura tridimensional de las proteínas como la cristalografía de rayos X, la resonancia magnética nuclear y la microscopía crioelectrónica, estas son costosas y pueden requerir mucho tiempo. Esto es evidenciado con el número de secuencias proteicas reportadas en la base de datos UNIPROT, aproximadamente 250 millones [32], el cual supera por un factor de más de 1000 veces al número de estructuras resueltas en la base de datos de proteínas PDB (212,303 disponibles al 2023) [33]. Debido a esto el desarrollo de técnicas como la biología estructural computacional ha permitido la predicción de estructuras biológicas en tiempo récord. Siendo este el caso del algoritmo ALPHA-FOLD, el cual ha reportado en su base de datos un aproximado de 214 millones de modelos a la fecha, esto último desde su implementación en el 2011 [34]. Estas técnicas no sólo han permitido predecir estructuras tridimensionales, sino también modelar interacciones moleculares posibilitando evaluar la dinámica conformacional de las estructuras solas o la formación de un complejo de ligando receptor.

Basado en la información descrita anteriormente, estas técnicas pueden clasificarse en tres tipos principalmente: Modelado por homología, acoplamiento y dinámica molecular [35]. Por un lado, el modelado molecular permite obtener estructuras tridimensionales mediante el uso de una secuencia peptídica de interés. Llegando a existir variantes de esta técnica que permiten construir estructuras *ab-initio* o utilizando la información espacial de otras proteínas resueltas experimentales como plantillas[36,37]. El acoplamiento molecular es un método que pretende simular la interacción entre una proteína y un ligando. Esto último mediante la exploración de diferentes posiciones y orientaciones del ligando en el sitio de unión del receptor. Para ello estos programas calculan la energía de interacción en cada configuración, permitiendo con ello determinar la conformación más estable y, por tanto, más probable a ocurrir en la realidad[38,39]. Asimismo, la dinámica molecular es una técnica de simulación por computadora que permite visualizar sistemas biológicos, como pueden ser complejos ligando-receptor, durante un determinado periodo de tiempo. Logrando con ello seguir la dinámica de interacción de diferentes moléculas biológicas, evaluar la estabilidad de complejos en función del tiempo, así como observar cambios conformacionales de un sistema en particular. Esta última técnica, a pesar de ser costosa computacionalmente, es primordial para mejorar la certeza de los resultados generados por el modelado y acoplamiento molecular. Siendo el uso de la información experimental existente para enriquecer los modelos, crucial para mejorar la fiabilidad de estos para su uso en el diseño racional[40,41]. Este enfoque computacional, no sólo acelera el proceso de desarrollo de fármacos, sino que también reduce los costos de investigación permitiendo un desarrollo de moléculas terapéuticas efectivas para el abordaje de enfermedades complejas y específicas[42,43].

ANTECEDENTES



3 Antecedentes.

3.1 β -toxinas de alacrán del género *Centruroides*

Las β -neurotoxinas del género *Centruroides* son péptidos de entre 60-70 aa que presentan una identidad de secuencia arriba del 60 por ciento, conservando el característico arreglo tridimensional de las toxinas de tipo β estabilizadas por 4 puentes disulfuro (Ver figura 2A). Estas β -toxinas se unen al sitio 4 de los Nav's a través de la su interacción con los segmentos conectores de las regiones transmembranales de los sDSV-II y el sDFP-III [5,44,45]. La unión de estas toxinas produce la reducción del pico de la corriente máxima, así como el corrimiento del potencial (umbral) de activación a valores más negativos (Ver figura 2B). Este efecto de modificar la voltaje-dependencia de activación es atribuido a un mecanismo, descrito por Cestele y colaboradores en 1998, conocido como el atrapamiento del sensor de voltaje (aS4) [5]. Esta hipótesis sugiere que las β -neurotoxinas interactúan directamente sobre el sensor de voltaje (S4) del sitio 4 de los Nav's, manteniéndolo en una conformación despolarizada (abierta) posteriormente a su inactivación. En consecuencia, esta configuración exhibida por parte del S4 permite disminuir la energía de activación del canal, promoviendo la apertura del canal a potenciales más negativos (Ver figura 2C). A pesar que las β -neurotoxinas tienen la capacidad de interactuar con varias isoformas de los Nav's, la mayoría de estas toxinas, descritas en la literatura, no presentan actividad sobre canales relacionados a la nocicepción, como lo son los Nav1.7, 1.8 y 1.9 [6,8].

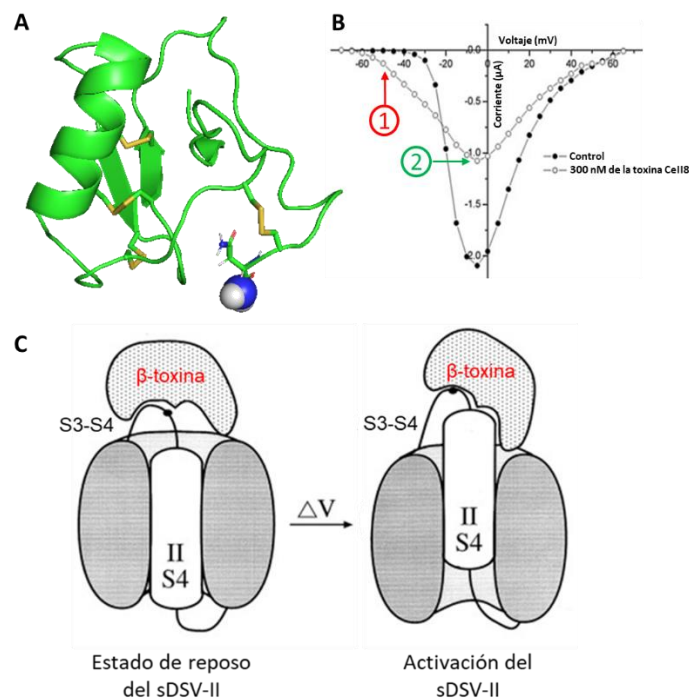


Figura 2. Estructura tridimensional, efecto electrofisiológico y mecanismo de atrapamiento de sensor de voltaje de β -neurotoxinas. Estructura tridimensional de la β -neurotoxina nCsslI (PDB ID: 2LI7) (A). Efecto de la unión de la β -neurotoxina Cell8 sobre la activación (círculo 1 y flecha roja) y la corriente (círculo 2 y flecha verde) del hNav1.7 (B). Tomado y editado de Vandendriessche y colaboradores en el 2010 [12]. Mecanismo de atrapamiento del sensor de voltaje (C). Tomado y editado de Cestele y colaboradores en 1998 [5]. Puentes disulfuro coloreados de amarillo. Amidación del C-terminal resaltado en esferas de color azul y blanca.

3.2 Superficie activa de las β -toxinas de alacrán del género *Centruroides*.

Estudios de mutagénesis sitio dirigida, realizados sobre la toxina C_{ss}IV, revelaron la existencia de residuos conservados en secuencia, en la mayoría de las toxinas del género *Centruroides*, que son importantes en la actividad y afinidad con el Nav1.2. Estos residuos, nombrados como superficie activa, están agrupados en cuatro regiones importantes a lo largo de la secuencia de estas toxinas. La primera región, localizada en el N-terminal, está representada por un único aminoácido aniónico (GLU15), el cual se caracteriza por no generar cambios de afinidad aparente al momento de su mutación. Sin embargo, la sustitución de este residuo provoca la pérdida del efecto de mover los potenciales de activación a valores más negativos. Debido a la importante función de este GLU15 en la alteración de la voltaje dependencia, se hipotetiza que este residuo es el responsable del fenómeno de atrapamiento del sensor de voltaje. Sin embargo, actualmente se conocen otras toxinas del género *Centruroides*, como es el caso de C_n8, que no presentan aminoácidos aniónicos en la región de N-terminal, por lo que se cree que el motivo Glu15 no es el único medio por el cual se pueda facilitar el α S4 (Ver figura 3). Por otro lado, las tres regiones restantes únicamente están involucradas en la pérdida de afinidad por parte de la toxina con su receptor. Estas zonas están comprendidas por las secciones localizadas entre la primer asa conectora y la α -hélice del N-terminal (LEU19, ASN22, TYR24, ARG27, GLU28) conocida como región farmacófora; un grupo de aminoácidos aromáticos localizados entre la segunda y tercera hoja β (TYR40, TYR42 y PHE44) y residuos localizados en el extremo C-terminal (TRP58) (Ver figura 3) [46]. Por otro lado, las β -neurotoxinas del género *Centruroides* presentan una característica distintiva, como lo es la presencia de una modificación postraduccional en el extremo C-terminal. Esta alteración sustituye el grupo carboxilo de la cadena principal por una amina primaria, siendo este último fenómeno conocido como amidación (Ver figura 2A). El atributo, presente en el extremo carboxilo terminal de estas β -toxinas, está reportada como un motivo importante en la afinidad por parte de estos péptidos con su respectivo blanco molecular [10,11]. A pesar de que el sitio 4 de los Nav's presentan variabilidad en secuencia entre isoformas, se cree que estas β -toxinas, al presentar el mismo plegamiento y una elevada identidad de secuencia, pueden estar interactuando de una manera similar con su receptor. Siendo estas zonas reportadas en este estudio importantes para explicar el fenómeno de unión de estas toxinas con sus blancos moleculares [46].

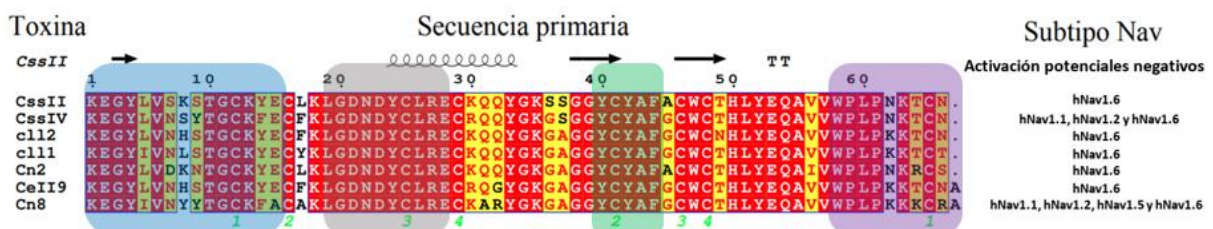


Figura 3. Alineamiento de secuencia de β -neurotoxinas del género *Centruroides* con superficie activa coloreada según su zona. Región donde se localiza el residuo aniónico encargado de atrapar el sensor de voltaje (azul), zona farmacófora (gris), grupo de residuos aromáticos (verde) y residuos localizados en el C-terminal (morado). Estructura secundaria de las β -neurotoxinas representada con flechas y listones en la parte superior del alineamiento. Actividad de mover los potenciales de activación a valores más negativos en distintas isoformas de los Nav's, representado a la derecha del alineamiento.

3.3 Mecanismo molecular de interacción β -neurotoxinas del género *Centruroides*.

Estudios de dinámica molecular realizados, por Chen y Chung en el 2000, para las β -toxinas CssIV y Cn2 muestran un modelo de interacción con el subdominio sensor de voltaje del dominio II (sDSV-III) de los Nav1.2 y Nav1.6 respectivamente [47]. En ambos modelos, se exhibe una cierta similitud en las interacciones formadas por parte de cada una de las toxinas sobre sus respectivos Nav's (Ver figura 4A y 4B). En este trabajo se observó un gran número de residuos importantes en la afinidad para CssIV, reportados por Cohen y colaboradores en el 2005, en interacción con el sDSV-II del Nav1.2 [46]. A pesar de que la toxina Cn2 no presenta los mismos residuos que el péptido CssIV, esta primera mostró zonas similares en secuencia en interacción con el canal Nav1.6. Un hallazgo relevante de este estudio fue la visualización del residuo Glu15 de ambas toxinas en interacción con una carga de apertura (Arg853), del sensor de voltaje. Esta interacción se dio a través de un enlace iónico, el cual, fue correlacionado con el mecanismo de atrapamiento del sensor de voltaje propuesto por Cestele y colaboradores en 1998 [5]. La relación entre el enlace Glu15-Arg853 con el atrapamiento del sensor de voltaje fue sustentada por el hecho que este residuo aniónico ha sido reportado como primordial para generar uno de los efectos β -neurotóxicos exhibidos por estas proteínas [46]. Observando que, cuando Glu15 es sustituido por otro residuo la toxina pierde la habilidad de mover los potenciales de activación a valores más negativos del Nav1.2. A pesar de que este estudio es el primer y único acercamiento del mecanismo molecular de interacción de las β -toxinas con los sDSV, aún existe un vacío en la literatura debido a que en este trabajo no fue considerado el subdominio formador del poro del DIII (sDFP-III). Esta última región, se encuentra localizada al costado del sDSV-II, orientado en el centro del canal, y está reportado como importante para el fenómeno de unión de las β -neurotoxinas con sus respectivos blancos moleculares [45]. Pudiendo este sDFP-III ser fundamental para dilucidar el papel de otras regiones de estos péptidos en la formación de los complejos toxina/canal.

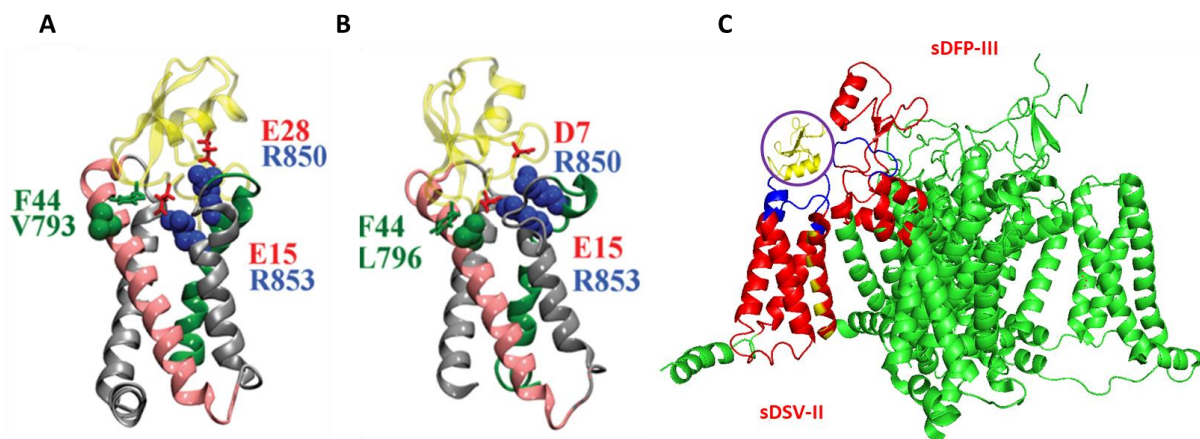


Figura 4. Modelos de interacción de β -neurotoxinas de alacrán sobre canales Nav's. Modos de interacción de los complejos CssIV/Nav1.2 (A) y Cn2/Nav1.6 (B). Tomado de Chen and Chung en el 2010 [47]. Residuos de interacción por parte de los sDSV-II representados con esferas de van der Waals. Residuos de interacción por parte de las toxinas CssIV y Cn2 representados con palos y bolas. Residuos de interacción coloreados según su carga. Posible modo de unión de β -neurotoxinas sobre el sitio 4 de los canales Nav's (C). Sitio 4 de unión de β -toxinas coloreado en color rojo. Asas conectoras involucradas en la unión de β -toxinas coloreadas de azul. coloreadas de amarillo.

3.4 Expresión heteróloga de β -neurotoxinas de alacrán del género *Centruroides*

La expresión heteróloga es una técnica que nos permite la producción de una proteína utilizando un organismo diferente al original del producto de interés. Esta metodología ha permitido la obtención de moléculas de importancia médica, como es el caso de las toxinas recombinantes de alacrán (rScTx) (Ver tabla 3). A pesar del limitado número de reportes de rScTx, estos estudios exponen la viabilidad de utilizar sistemas de expresión recombinante para la obtención de β -neurotoxinas con actividad biológica. Siendo la expresión heteróloga una alternativa para la obtención de estos péptidos de importancia médica como es el caso de las β -toxinas de los géneros *Tityus*, *Leirus*, *Buthus* y *Centruroides* [46,48–50].

Tabla 3. Toxinas de alacrán obtenidas mediante expresión heteróloga (rScTx)

Toxina	Familia	Tamaño de secuencia aminopeptídica	Puentes disulfuro	Uniprot
Maurocalcina	CaScTx	33	3	P60254
Maurotoxina	KvScTx	34	4	P80719
LqhalT	α NavScTx	66	4	P17728
Bsaull	α NavScTx	64	4	Q2NNB8
Pg8	α NavScTx	63	4	P60266
LqhIT2	β NavScTx	61	4	Q26292
CssIV	β NavScTx	66	4	P60266
CssII	β NavScTx	66	4	P08900
BmαTX14	β NavScTx	54	4	Q95NK7
Ts1	β NavScTx	61	4	P60266

*CaScTx: Toxinas de alacrán selectivas a canales de calcio; KvScTx: Toxinas de alacrán selectivas a canales de potasio; α NavScTx: α -toxinas de alacrán selectivas a canales de sodio; β NavScTx: β -toxinas de alacrán selectivas a canales de sodio

El péptido CsslI es una β -neurotoxina, extraída del veneno del alacrán *Centruroides suffusus suffusus*, el cual, exhibe un arreglo tridimensional clásico perteneciente a esta familia de proteínas [51]. Este péptido es de relevancia médica debido a que es la molécula más abundante y tóxica del veneno, con una LD₅₀ de 0.7 ug /20 g de ratón [52]. Esta toxicidad está dada por la capacidad de esta β -toxina de interactuar con el Nav1.6, exhibiendo el efecto de reducir el pico de corriente máxima y desplazar el umbral de activación a valores más negativos. En el 2007, Estrada y colaboradores, produjeron el péptido CsslI mediante expresión heteróloga (rCsslI), sin embargo, esta toxina recombinante exhibió una disminución en su actividad en una razón de 15 veces con respecto a la proteína nativa de CsslI (nCsslI). La rCsslI, al ser un producto de expresión en *E. coli*, no exhibió la característica amidación del C-terminal presentada por la mayoría de los péptidos de efecto β del género *Centruroides*. Siento esta falta de amidación, la única diferencia vinculada con la pérdida de actividad por parte de rCsslI en relación a nCsslI (Ver figura 5A, 5B y 5D) [10]. Debido a esto, Estrada y colaboradores en el 2011 estudiaron el efecto de agregar cargas positivas en el C-terminal de la toxina rCsslI, obteniendo como producto final a la variante rCsslI-T64R/N66R (rCsslI-RCR) (Ver figura 5C y 5D). Esta variante peptídica, rCsslI-RCR, recuperó la afinidad perdida por la rCsslI, presentando una unión similar al de la toxina nativa con el canal Nav1.6. Este resultado permitió resaltar la importancia de la amidación, así como las implicaciones de la carga en el C-terminal para el apropiado funcionamiento de estas proteínas con sus blancos moleculares [11].

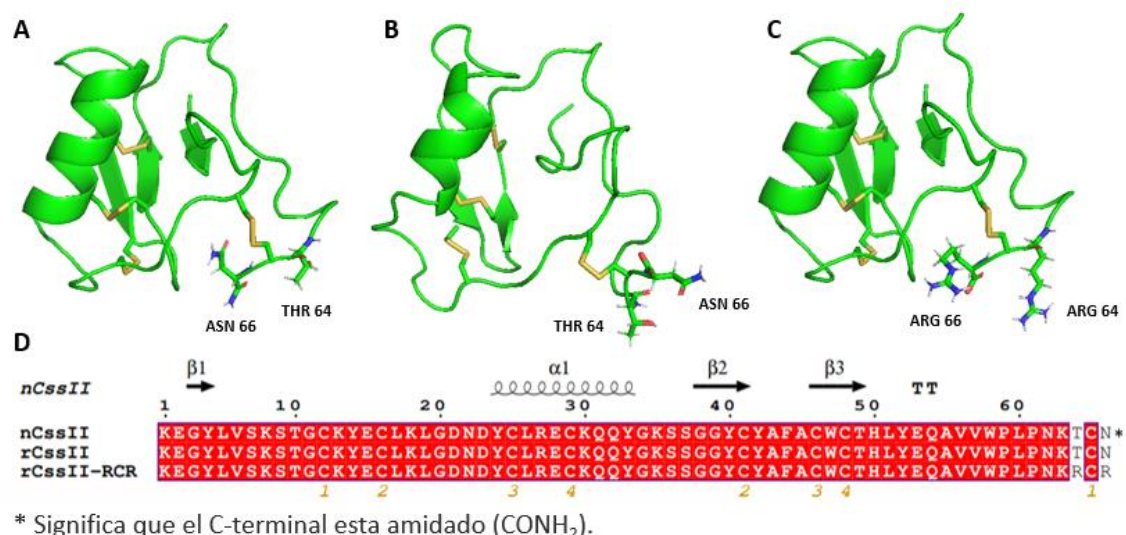


Figura 5. Estructura tridimensional y alineamiento de secuencia de péptidos recombinantes de la β -neurotoxina nCsslI. Toxina nCsslI (PDB ID: 2LI7) (A). Toxina rCsslI (PDB ID: 2LJM) (B). Toxina rCsslI-RCR (C). Alineamiento de secuencia de variantes de la β -neurotoxina nCsslI (D). Números amarillos en el alineamiento indican las cisteínas que forman los puentes disulfuro. Aminoácidos del C-terminal representados en barras y bolas. Puentes disulfuro coloreados de amarillo.

3.5 β -neurotoxinas de alacrán del género *Centruroides* con actividad sobre Nav's relacionados a la nocicepción.

A pesar de que las β -neurotoxinas del género *Centruroides* son promiscuas en su interacción con diferentes isoformas de los Nav's, el número de reportes de toxinas con la capacidad de modular canales relacionados a la nocicepción es prácticamente nulo. El único reporte existente en la literatura de un péptido de alacrán del género *Centruroides* con actividad tipo β fue descrito por Vandendriessche y colaboradores en el 2010. En este estudio se purificó del veneno del alacrán *Centruroides elegans* a la toxina Cell8, observando que este péptido presentó la capacidad de reducir el pico de la corriente máxima y desplazar el umbral de activación a valores más negativos de la isoforma del Nav1.7 [12]. Esta toxina, presenta características contrastantes a nivel de secuencia primaria en comparación con las β -neurotoxinas convencionales de alacrán del género *Centruroides*. Uno de los rasgos diferenciables exhibidos por parte de este péptido se localiza en el C-terminal, apreciando que esta región no presenta la distintiva amidación que caracteriza a esta familia de toxinas. Así mismo, el péptido Cell8 posee un residuo con carga negativa al final de su secuencia (ASP), siendo este último contrario a los aminoácidos habituales, polares o catiónicos, que presenta las β -toxinas de alacrán (Ver figura 3 y figura 6C). Por otro lado, la región del N-terminal de Cell8 exhibe una delección en secuencia de tres residuos, así como la ausencia del GLU15 importante en el atrapamiento del sensor de voltaje (aS4) en comparación con otras toxinas tipo β del género *Centruroides*. Sin embargo, esta toxina presenta dos residuos aniónicos (GLU10 y GLU11) cercanos a la posición del GLU15, las cuales podrían estar implicadas en el aS4, promoviendo la apertura del hNav1.7 a potenciales más negativos. Finalmente, este péptido es la primera toxina descrita en la literatura en presentar dos aminoácidos MET en la región inicial y final de su secuencia respectivamente. Siendo estos últimos residuos posiblemente importantes para la interacción con su blanco molecular (Ver figura 6C) [12].

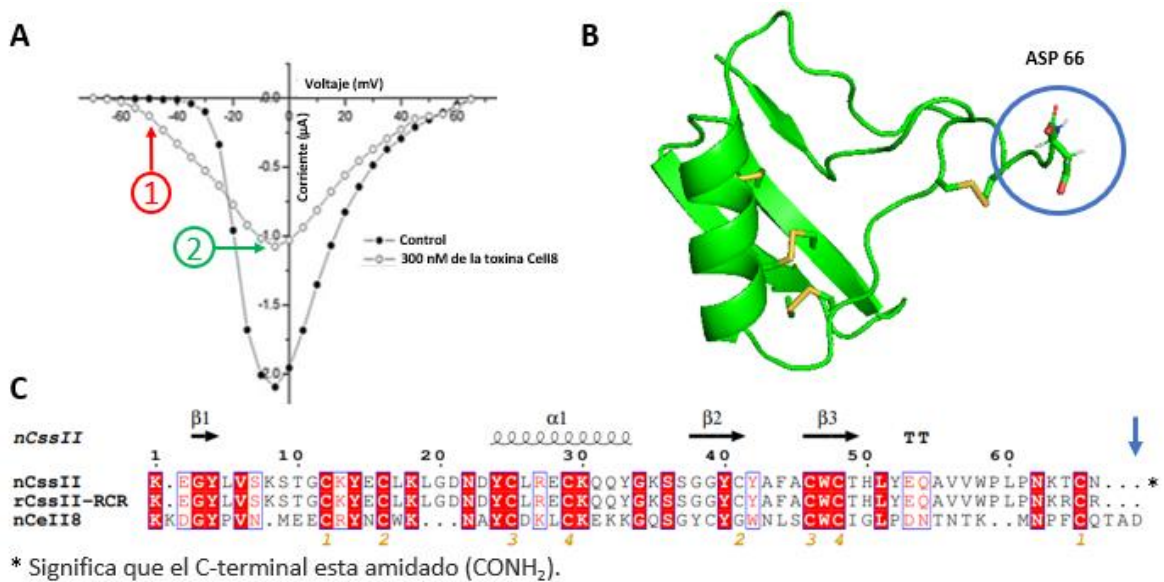
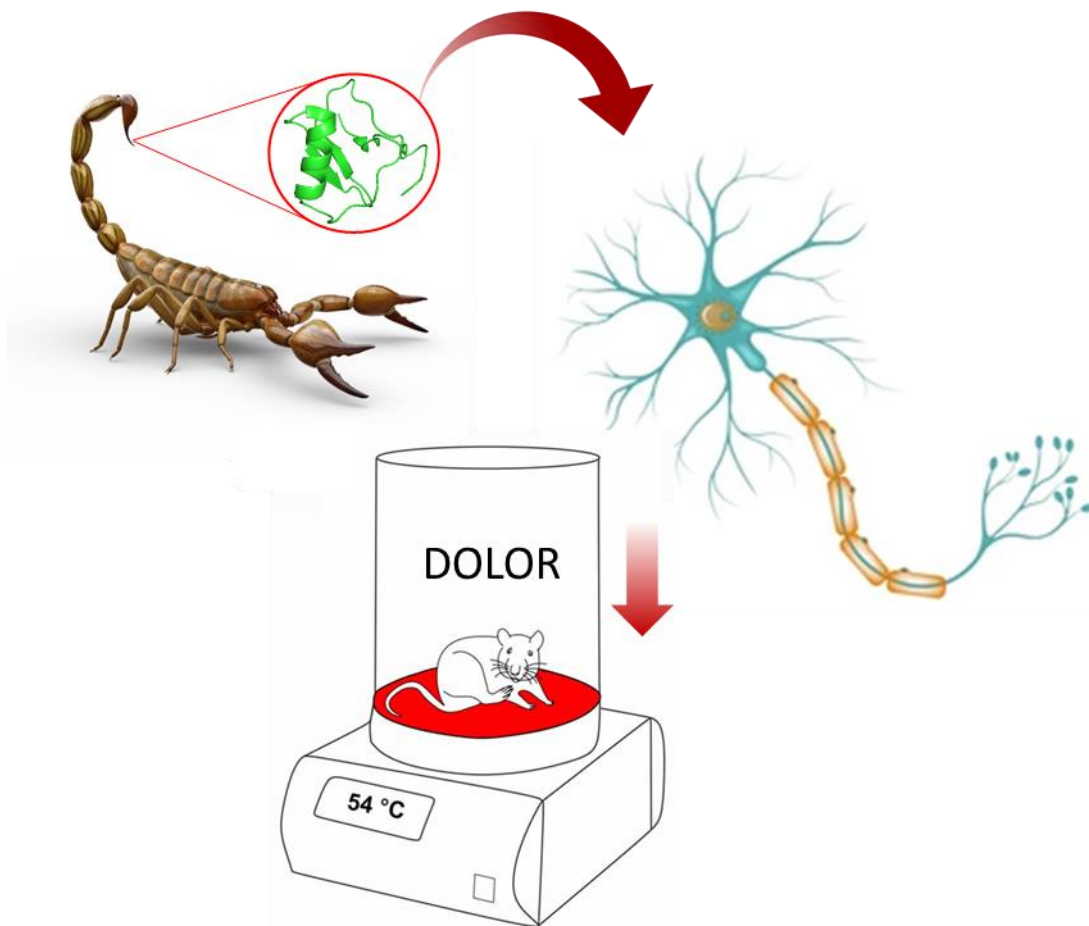


Figura 6. Efecto electrofisiológico, estructura tridimensional y secuencia de la β -neurotoxinas Cell8. Efecto tipo β de la toxina Cell8 (A). Apertura de los canales a potenciales más negativos (círculo rojo) y reducción del pico de corriente máxima (círculo verde). Estructura tridimensional de la toxina Cell8 (B). Alineamiento de secuencia de *nCssII*, *rCssII-RCR* y Cell8. Aminoácidos del C-terminal y puentes disulfuro representados en palos y bolas. Enlaces disulfuro coloreados de amarillo en la estructura tridimensional y en números bajo la secuencia de Cell8.

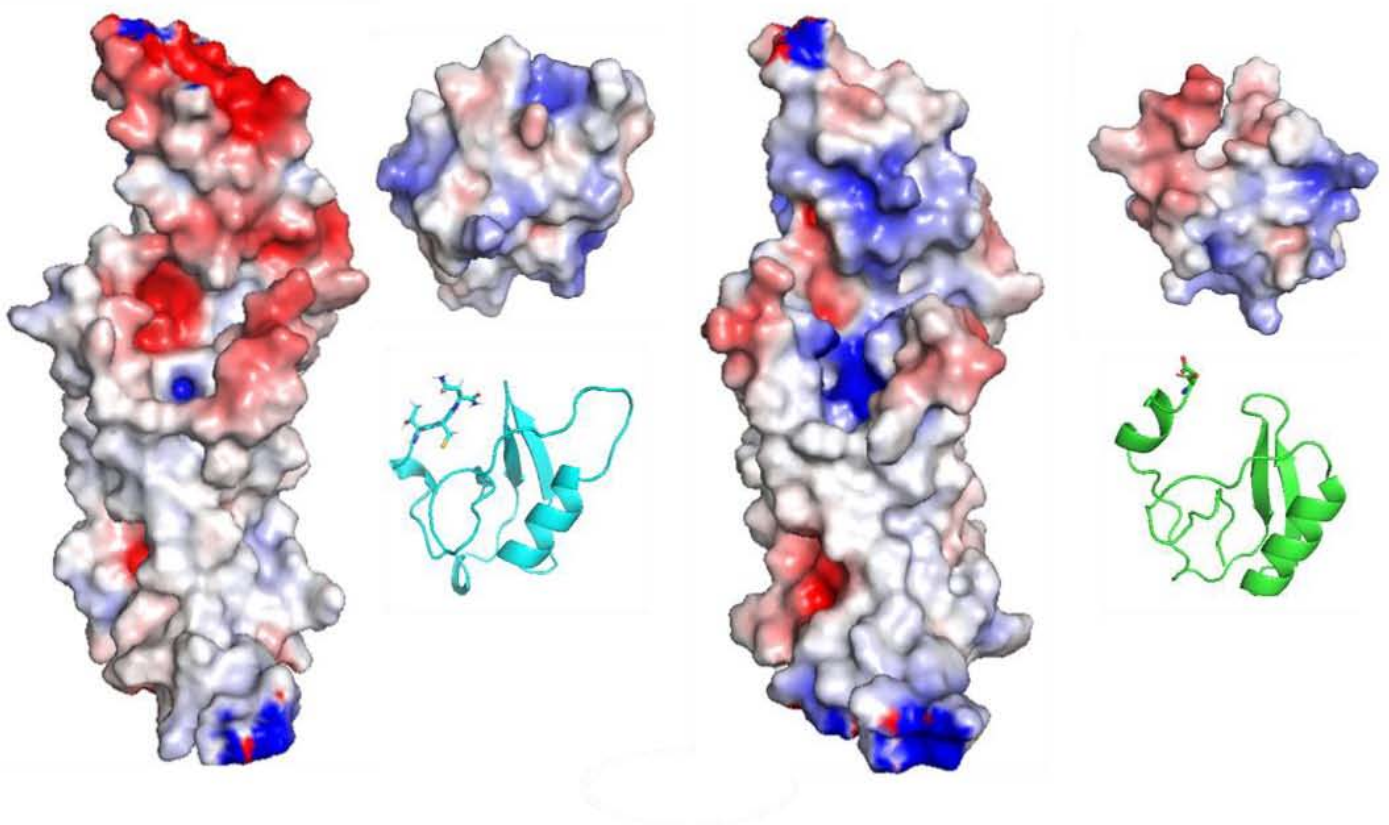
JUSTIFICACION



4 Justificación

Debido a la relación existente entre el mal funcionamiento de los canales Nav's y el desarrollo de diferentes canalopatías, estas proteínas se han convertido en blancos moleculares importantes para el tratamiento de diferentes patologías. Por otro lado, las toxinas provenientes de los venenos de alacrán, como las β -neurotoxinas (β -NTxE), exhiben la habilidad de modular a los canales Nav's, convirtiendo a estos péptidos en una alternativa a la búsqueda de moléculas con potencial terapéutico. Siendo un ejemplo de ello la β -toxina Cell8, la cual, es el único reporte existente de una β -NTxE con la habilidad de modular el canal relacionado a la nocicepción el hNav1.7. Debido al escaso conocimiento en la unión de las β -NTxE sobre los canales Nav's, así como el nulo conocimiento de regiones importantes por parte de la toxina Cell8 con el canal hNav1.7, en este proyecto se plantea utilizar técnicas de biología estructural computacional para determinar regiones importantes en la interacción de las β -toxinas nCsslI y rCsslI-RCR sobre el hNav1.6. Estas últimas dos toxinas presentan suficiente información experimental para validar los modelos de interacción, posibilitando inferir regiones poco evidentes en la secuencia aminoacídica de la toxina Cell8 bajo la teoría de estructura función de las proteínas. Esto permitirá generar variantes del péptido rCsslI-RCR con la capacidad de modular el canal hNav1.7, logrando con ello la obtención de un péptido antinociceptivo.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS



5 Hipótesis

La generación de modelos de interacción de las β -toxinas nCsslI y rCsslI-RCR con el hNav1.6, permitirá obtener información estructural que posibilite producir variantes peptídicas de la toxina HisrCsslI-RCR con la habilidad de modular otros canales importantes como el hNav1.7 y producir un péptido con efecto antinociceptivo.

6 Objetivos

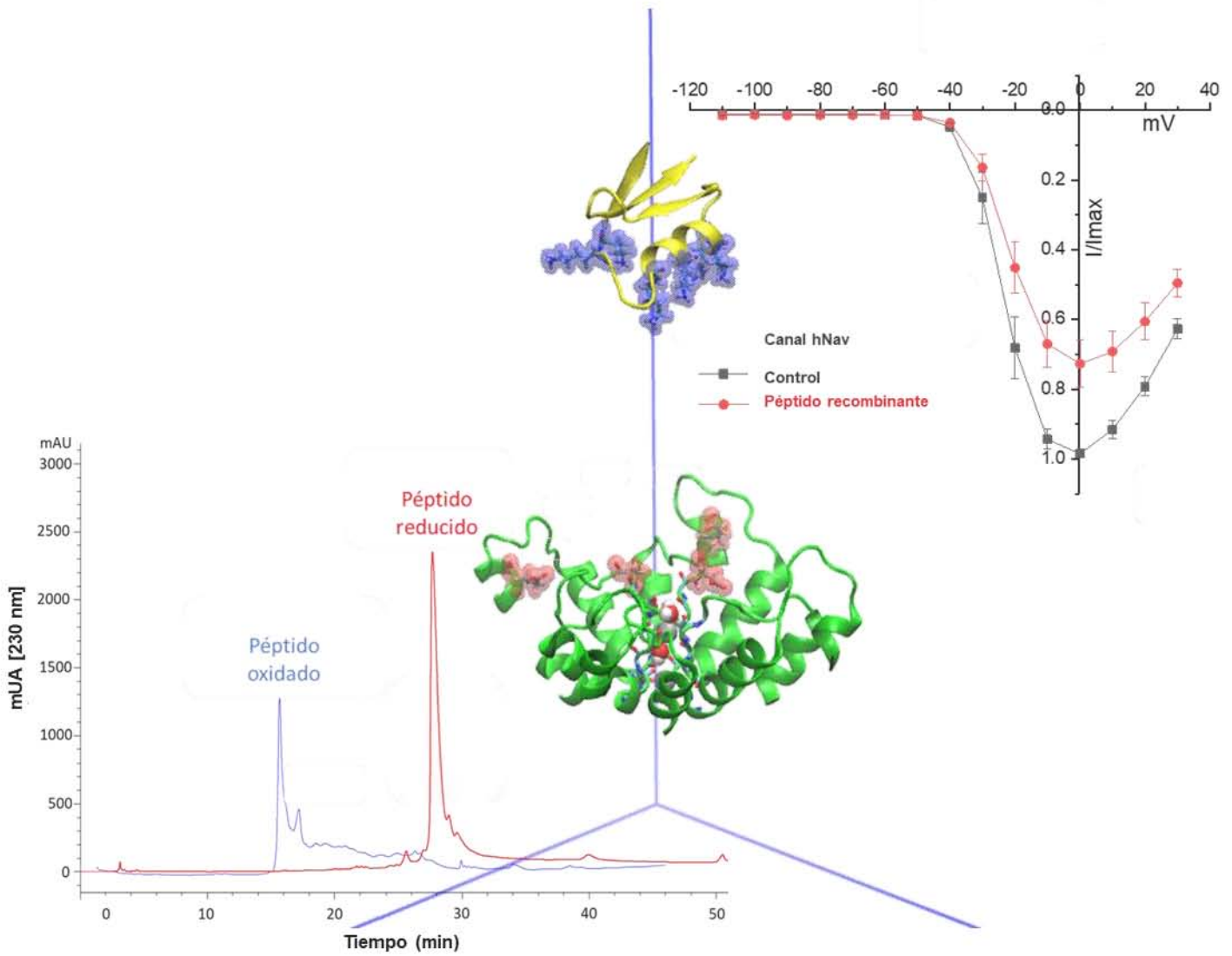
6.1 Objetivo general

Estudiar el fenómeno de interacción de las toxinas β -toxinas nCsslI y rCsslI-RCR con el hNav1.6, permitiendo con ello mimetizar regiones de la toxina Cell8 en el péptido HisrCsslI-RCR para obtener variantes peptídicas con la habilidad de modular el canal hNav1.7, y producir con ello un efecto antinociceptivo en un modelo murino.

6.2 Objetivos específicos

- Obtener modelos tridimensionales más representativos del sitio 4 de las isoformas de los canales hNav1.6 y hNav1.7, en su contexto fisiológico a través de simulaciones por dinámica molecular.
- Generar modelos tridimensionales más representativos de las variantes peptídicas de nCsslI, rCsslI-RCR y nCell8 en condiciones fisiológicas a través de simulaciones por dinámica molecular.
- Evaluar la dinámica de interacción de los complejos nCsslI/hNav1.6 y rCsslI-RCR/hNav1.6 utilizando simulaciones de dinámica molecular.
- Diseñar y expresar variantes peptídicas de la toxina HisrCsslI-RCR.
- Plegar *in vitro* las variantes peptídicas de la toxina HisrCsslI-RCR.
- Probar la actividad de las variantes peptídicas de la toxina HisrCsslI-RCR a través de ensayos biológicos en un modelo murino.
- Evaluar el efecto electrofisiológico de las variantes peptídicas de HisrCsslI-RCR con los canales hNav1.6 y hNav1.7.
- Valorar el efecto de las variantes peptídicas de HisrCsslI-RCR mediante ensayos de nocicepción en un modelo murino.

METODOS



7 Métodos

Para el desarrollo de este proyecto se utilizó el diagrama general mostrado en la figura 7, siendo la primera parte un estudio computacional del modo de unión de las β -neurotoxinas, para posteriormente utilizar la información para diseñar variantes peptídicas que puedan generar un efecto antinociceptivo vía interacción con el hNav1.7.

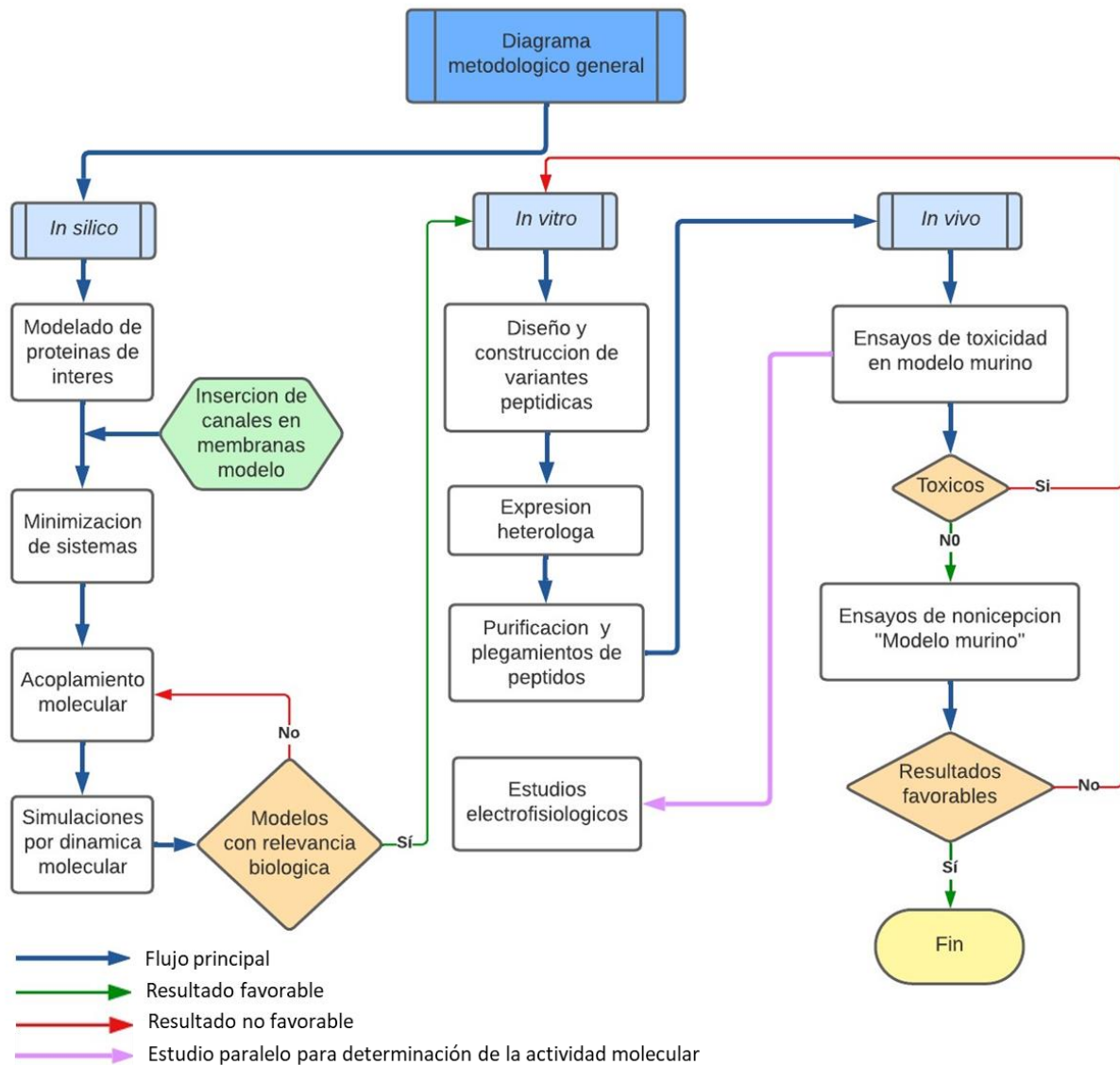


Figura 7. Diagrama metodológico general del proyecto

METODOS COMPUTACIONALES

The image shows a terminal window with a shell script and a PyMOL window. The terminal window is titled "GNU nano 4.8" and "Doctorado.sh". The script calculates RMSD for all models, sorts them, and relates the RMSD to the model's score. The PyMOL window shows a protein structure visualization with a list of models on the right.

```
andrei@andrei: ~/DD-Int_respalDOS/Files-Doctorado/MD/Modelado_canales_DII/hNav16/Normal/Modelado2
GNU nano 4.8 Doctorado.sh Modificado
#!/bin/sh
#ESTE CODIGO ME CALCULA EL RMSD DE TODOS LOS MODELOS
for i in $(ls *.pdb); do
echo -e "REFERENCE DII-Nav17.pdb\nMOBILE $i\nATOMS CA,C,N,O\nREADALIGNMENT Q-T.ali\nFIT" > ${i%.pdb}.txt
done
for i in $(ls *.txt); do
profit -f $i > Result.txt;
grep -E 'Starting script|RMS' Result.txt
done
rm *.txt
#ESTE CODIGO ME ORDENA EL RMSD
for i in `cat rms_local.txt`; do echo
sed 's/ Q./\nQ./g ; s/txt/pdb/g' best_rms
rm best_rms
sort -k2 best_rms_notsort > best_rms_notsort
rm best_rms_notsort
#ESTE CODIGO ME RELACIONA EL RMSD CON EL SCORE
awk '{print $1}' best_rms_sort > nameRmsd_sort
awk '{print $1,$3}' models_score > models_score_sort
for i in $(cat nameRmsd_sort); do
grep $i model_Dope_score >> dope_score_sort
done
awk '{print $2}' dope_score_sort > dope_score_rmsd
awk '{print $2}' best_rms_sort > rmsd_sort
paste nameRmsd_sort rmsd_sort dope_score_rmsd > rmsd_sort_dope_score
rm rmsd_sort dope_score_rmsd

```

PyMOL window showing a protein structure visualization. The structure is shown in a stick representation with a green ribbon. The right panel shows a list of models:

all	A	S	H	L	C	
Q.B99990100	✓	A	S	H	L	C
Q.B99990101	✓	A	S	H	L	C
Q.B99990102	✓	A	S	H	L	C
Q.B99990103	✓	A	S	H	L	C
Q.B99990104	✓	A	S	H	L	C
Q.B99990105	✓	A	S	H	L	C
Q.B99990106	✓	A	S	H	L	C
Q.B99990107	✓	A	S	H	L	C
Q.B99990108	✓	A	S	H	L	C

Mouse Mode 3-Button Viewing
Buttons L M R Wheel
& Keys Rota Move MovZ Slab
Shft +Box -Box Clip MovS
Ctrl Move PKAt PK1 MvS2
CtSh Sele Orig Clip MovZ
SnglClk +/- Cent Menu
DblClk Menu - PKAt
Selecting Residues
State 1/ 1

7.1 Métodos computacionales

7.1.1 Obtención de la estructura tridimensional de toxinas β -neurotoxinas.

Se empleó la estructura de resonancia magnética de la toxina nCsslI (ID: 2LI7) depositada en el banco de datos de proteína (PDB) [34]. Se seleccionó la estructura más representativa reportada en el archivo de estructura y se utilizó la herramienta de mutagénesis de PyMol [35] para la generación de la variante CsslI-RCR. Por otro lado, se utilizó el servidor I-Tasser para la obtención de la β -neurotoxina Cell8 utilizando las puntuaciones proporcionadas por el algoritmo (C-score y TM-score) para la selección del modelo[53]. Todos los sistemas fueron minimizados en vacío a través de 5000 pasos de Steepest Descent, usando una tolerancia máxima de 1000 Kcal/mol nm. La estructura de nCsslI fue amidada utilizando el campo de fuerzas CHARMM 36 [24] a través de GROMACS v5.1.4[25].

7.1.2 Obtención de la estructura tridimensional de hNav's.

Tomando la premisa que los dominios transmembranales de los hNav's son altamente conservados en secuencia, se empleó la técnica de modelado molecular, a través del uso del programa Modeller[54], para la obtención de las estructuras tridimensionales correspondientes. La secuencia de los canales hNav1.6 (Q9UQD0) y hNav1.7 (Q15858) extraído del UNIPROT[55] así como el cristal del canal hNav1.7 (PDB ID: 6J8J) fueron utilizadas para guiar el proceso de modelamiento. Se generaron un total de 10,000 modelos utilizando el RMSD [20] de cadena principal y la puntuación DOPE para seleccionar al conjunto de modelos más frecuentados. Se seleccionó el mejor modelo en función de la calidad estructural de la cadena principal, ángulos phi (ϕ) y psi (ψ), utilizando PROCHECK [21]. Se truncó la estructura final de cada canal conservando únicamente el sitio 4 de unión de β -neurotoxinas que corresponde al subdominio sensor de voltaje II (sDSV-II) y al subdominio formador del poro III (sDFP-III). Siendo estas regiones comprendidas por los residuos 735 al 870 para el sDSV-II y del 1317 al 1475 para el sDFP-III en el hNav1.6. Por otro lado, se usaron los residuos del 726 al 861 para el sDSV-II y del 1321 al 1461 para el sDFP-III en el hNav1.7. Todas las estructuras finales fueron minimizadas en vacío utilizando el algoritmo Steepest Descent, con una tolerancia máxima de 1000 KJ/mol, mediante Gromacs [23] usando un campo de fuerzas CHARMM36 [24].

7.1.3 Minimización de estructuras en vacío.

Todas las estructuras modeladas finales fueron minimizadas en vacío utilizando el algoritmo Steepest Descent, con una tolerancia máxima de 1000 KJ/mol, mediante Gromacs [23] usando un campo de fuerzas CHARMM36 [24].

7.1.4 Construcción de sistemas hNav's/membrana.

Para contrastar el efecto de simular únicamente el sitio 4 de unión de beta neurotoxinas respecto al canal completo, se embebió la estructura completa del canal hNav1.6 en una membrana compleja cuya mezcla de lípidos fuera lo más cercana a su entorno natural (Ver anexo I)[56] . Por otro lado, el sitio 4 de unión de beta neurotoxinas del hNav1.6 únicamente se embebió en una membrana modelo de POPO (150 x 150). Para ambos sistemas se empleó el servidor CHARGUI utilizando la herramienta *Membrane Builder* [54,57].

7.1.5 Minimización de estructuras sistemas.

Todos los sistemas fueron equilibrados mediante un ensamble NVT, precedido de un NPT, hasta mantener una temperatura de 298 °K (Nose-hoover) y una 1 atm de presión (Parrinello-Rahman). Todas las simulaciones fueron realizadas bajo condiciones de frontera periódicas, las interacciones electrostáticas de largo alcance fueron computadas usando el algoritmo particle-mesh Ewald. Todas las interacciones fueron ajustadas a 1.2 Å con un tiempo de integración de 2 fs escribiendo la trayectoria cada 10 ps[58]. Cada sistema fue realizado durante 200 ns de simulación con una concentración salina de 0.15M de NaCl, usando el modelo de agua Tip3P y empleando el campo de fuerzas CHARMM36 *all atom*[24]. Las simulaciones fueron hechas con GROMACsv2020 [25] en 32 procesadores, siendo las trayectorias generadas analizadas con la paquetería de GROMACS y VMD [33]. Se generaron mapas de potencial electrostático (MPE) para todos los modelos finales utilizando APBS-PDB2PQR [59].

7.1.6 Acoplamiento molecular

El acoplamiento se realizó mediante el software Haddock 2.4[38], utilizando los clústeres más poblados del sitio 4 del hNav1.6, así como el de los péptidos nCsslI y CsslI-RCR. Para guiar el acoplamiento se usaron los residuos, reportados como importantes para la interacción, localizados en las asas conectoras de los sDSV-II y al sDFP-III [26,27] (ver cuadros de color morado y cian en la figura 8), como entrada para el programa. Por otra parte, se seleccionaron a los residuos localizados en las asas conectoras del sDSV-II como regiones móviles. Para el caso de las toxinas, se utilizó todos los residuos reportados como importantes para la interacción CsslI-Nav12 [2], siendo estos residuos altamente conservados a lo largo de la secuencia de β-neurotoxinas. (Ver figura 8).

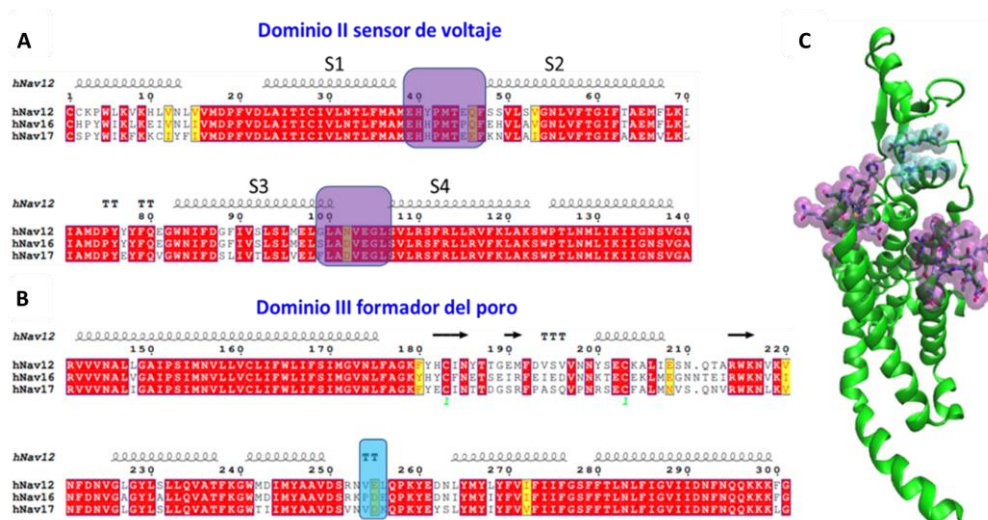


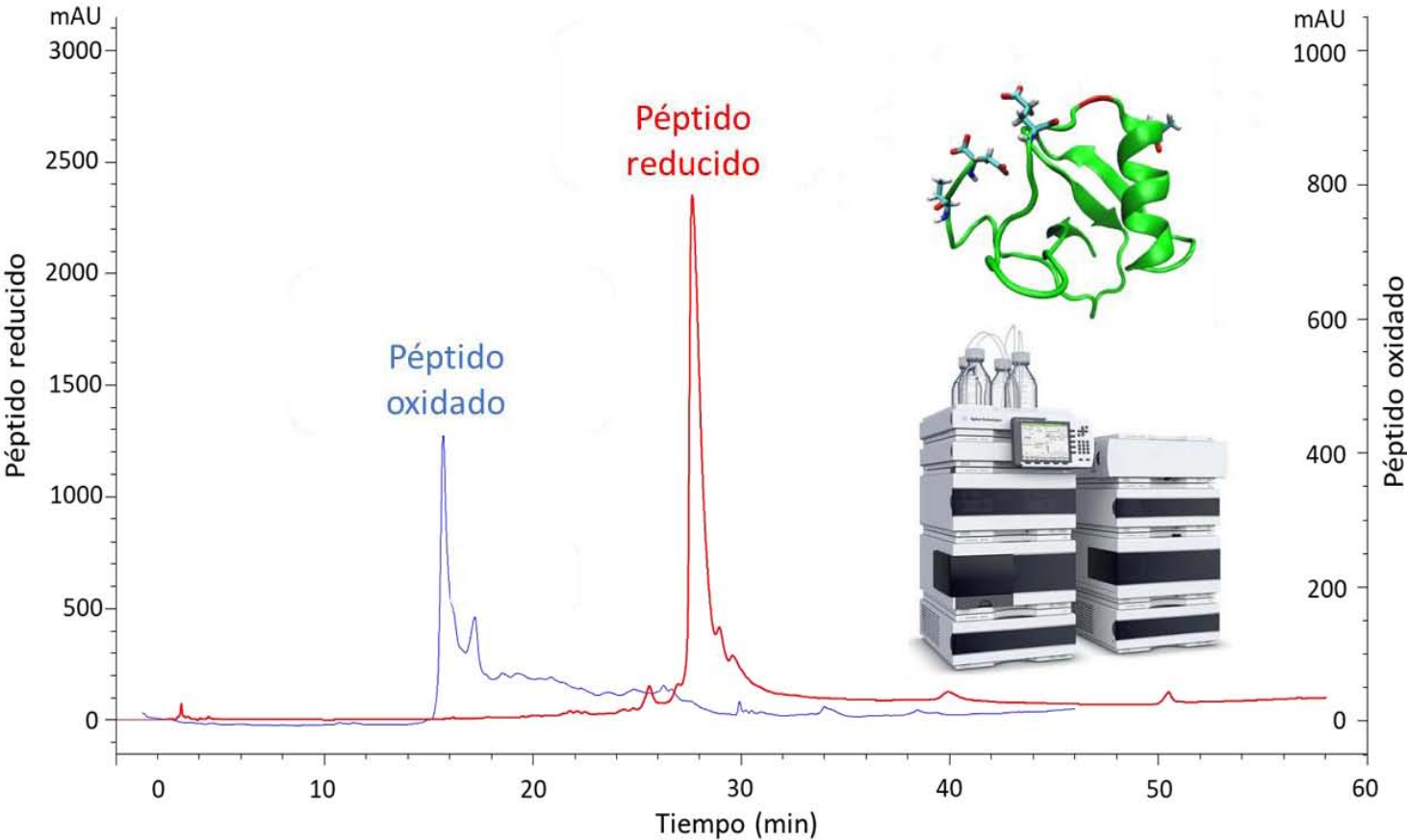
Figura 8. Sitio 4 de unión de β-toxinas de alacrán. Alineamiento de secuencia del dominio sensor de voltaje del dominio II (A) y el dominio formador del poro del dominio III (B). Estructura tridimensional del sitio 4 de unión de β-toxinas de alacrán (C). Los cuadros morados y cian representan regiones importantes para el acoplamiento toxina-canal.

7.1.7 Simulaciones por dinámica molecular

Para validar los acoplamientos, los complejos fueron simulados durante un total de 100 ns utilizando GROMACS. Todos los sistemas fueron equilibrados mediante un ensamble NVT, precedido de un NPT, hasta mantener una temperatura de 298 °K (Nose-hoover) y una 1 atm de presión (Parrinello-Rahman). Todas las simulaciones fueron realizadas bajo condiciones de frontera periódicas, las interacciones electrostáticas de largo alcance fueron computadas usando el algoritmo *particle-mesh Ewald*. Todas las interacciones fueron ajustadas a 1.2 Å con un tiempo de integración de 2fs escribiendo la trayectoria cada 10 ps[58]. Cada sistema fue realizado durante 100 ns de simulación con una concentración salina de 0.15M de NaCl, usando el modelo de agua Tip3P y empleando el campo de fuerzas CHARMM36 all atom [24]. Las trayectorias fueron analizadas con la paquetería de GROMACS y VMD [33].

METODOS EXPERIMENTALES

3



7.2 Métodos experimentales

7.2.1 Separación del veneno de *Centruroides elegans*

Se purificaron 4.8 mg de veneno liofilizado del alacrán *Centruroides elegans* disolviendo 1.2 mg de veneno en 1mL de solución A (agua con 0.1% TFA), para su posterior purificación en una columna C18 por rHPLC con un gradiente de acetonitrilo de 0 a 60 % con 0.1 % TFA en 60 min. Se seleccionó el pico localizado en el tiempo de retención 37.049, tiempo de elusión de la toxina de interés, y se prosiguió a su separación utilizando una columna cromatográfica de repulsión electrostática Polisulfoetil A PolyLC, con un gradiente de NaCl de 0 a 100% con 20% acetonitrilo en 50 min.

7.2.2 Obtención de variantes peptídicas de CsslI-RCR

Se utilizó la variante CsslI-RCR insertada en el plásmido pQE30, como plantilla para la construcción de las variantes peptídicas, mostradas en la Tabla 4. Para la obtención de dichas variantes se utilizó la técnica de PCR mutagénica propuesta por Liu y Naismith en 2008 [60].

Tabla 4. Secuencia de variantes peptídica de HisrCsslI-RCR.

Variante	Secuencia MRGSHHHHHHGSIEGR-TOXINA
HisrCsslI-RCR	KEGYLVSKSTGCKYECLKLGDN DYCLRECKQQYGKSSGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWPLPNKR CR
HisrCsslI-TCR	KEGYLVSKSTGCKYECLKLGDN DYCLRECKQQYGKSSGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWPLPNKTCR
HisrCsslI-TCD	KEGYLVSKSTGCKYECLKLGDN DYCLRECKQQYGKSSGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWPLPNKTCD
HisrCsslI-Del-D23A-RCR	KEGYLVSKSTGCKYECLK- - -NAYCLRECKQQYGKSSGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWPLPNKR CR
HisrCsslI-Del-D23A-TCD	KEGYLVSKSTGCKYECLK- - -NAYCLRECKQQYGKSSGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWPLPNKTCD
HisrCsslI-EE-RCR	KEGYLVSKSEECKYECLKLGDN DYCLRECKQQYGKSSGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWPLPNKR CR
HisrCsslI-EE-TCD	KEGYLVSKSEECKYECLKLGDN DYCLRECKQQYGKSSGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWPLPNKTCD

Los oligonucleótidos mutagénicos (Ver anexo II), presentaron un tamaño aproximado de entre 35 a 60 pb los cuales presentan una región complementaria entre el oligonucleótido directo, el oligonucleótido reverso y la plantilla denominada región sobrelapante (SP). Por otra parte, este par de oligos exhiben una región no complementaria entre ellos, pero sí con la plantilla denominada región no sobrelapante (No-S) (Ver Figura 9). La Tm de la región No-SP fue de 5 a 10°C superior a la Tm de la región SP.



Figura 9. Descripción de la configuración de oligonucleótidos utilizados en la PCR mutagénica.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L con una concentración o cantidad de materia (plásmido) para cada reactante ejemplificada en la tabla 5. Para la reacción de mutagénesis se utilizó el protocolo mostrado en la tabla 6.

Tabla 5. Reacción de PCR mutagénica			
Reactivos	Volumen (Ejemplo)	cantidad final	Solución
Fw Oligos	5 μ L	1 μ M	10 μ M
Rv Oligos	5 μ L	1 μ M	10 μ M
Buffer (10x)	5 μ L	1X	Buffer 10x
Enzima	1.2 μ L	NA	Enzima High Deff
dNTPs	10 μ L	200nM	1000 uM
Plásmido	4 μ L	10 ng	Solución 2.4 ng/ μ L
Agua	Aforar a 50uL		

Tabla 6. Condiciones de amplificación de PCR mutagénica			
	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo (min)	# de Ciclos
Pre-desnaturalización	95	5	1
Desnaturalización	95	1	
Alineamiento 1	Tm No-S -5	1	12
Extensión	72	10	
Alineamiento 2	Tm SP -5	1	1
Extensión	72	30	1

Los productos amplificados fueron tratados con 2 μ l de la enzima DpnI por 2 h a 37 $^{\circ}$ C, esto con el fin de degradar el plásmido parental (metilado). Posteriormente se transformaron en bacterias *E. coli* XL1 Blue utilizando 10 ng de la mezcla de reacción. Las células transformadas se sembraron en placas de agar LB adicionado con ampicilina y se incubaron toda la noche a 37 $^{\circ}$ C. Se extrajo plásmido de colonias resultantes con el kit High Pure Plasmid Isolation (ROCHE) y se prosigió a secuenciar para verificar la mutación.

7.2.3 Expresión de variantes peptídicas.

Se utilizó la cepa *E. coli* Shuffle como huésped para la expresión de las variantes de la toxina HisrCsslI-RCR. Las células químico-competentes se transformaron con 100 ng de ADN plasmídico por medio de choque térmico y se sembraron en placas con medio sólido LB con ampicilina (100 μ g/mL). Se prepararon pre-inóculos con las transformantes obtenidas en medio LB con ampicilina para posteriormente inocular matraces con un volumen final de 1L. Se iniciaron los crecimientos con densidades celulares ópticas (DO) de 0.05 (Determinada a 600 nm), una vez alcanzada una DO de 0.6 se indujo con IPTG a una concentración final de 1 mM y se mantuvieron a 16 $^{\circ}$ C y 200 rpm durante 14 h. Se extrajo la masa celular del cultivo mediante centrifugación a 7000 rpm durante 20 min, suspendiendo el *pellet* en Tris-HCl 50 mM pH 8 y posteriormente se realizó la lisis celular utilizando una prensa francesa “constant cell disruption” a 30 Kpsi. Finalmente separó la fracción soluble y los cuerpos de inclusión mediante centrifugación a 10000 rpm durante 20 min.

7.2.4 Purificación de variantes peptídicas por columna de afinidad a níquel

Ambas fracciones proteicas recombinantes se purificaron en columnas de afinidad a Níquel (resina Ni-NTA). La resina se equilibró pasando 10 volúmenes de Tris 50 mM pH 8, Cloruro de guanidinio 6 M, Una vez equilibrada la columna, se pasó el extracto proteico dos veces. A continuación, se realizó un primer lavado con 5 mL de Tris 50 mM, Cloruro de guanidinio 6 M, posteriormente se llevó a cabo un segundo lavado con 5 mL de Tris 50 mM, Cloruro de guanidinio 6 M e Imidazol a 40 mM pH 8. Después de lavada la columna, se hizo la elusión de los péptidos de fusión con Tris 50 mM pH 8, Cloruro de guanidinio 6 M e Imidazol a 400 mM pH 8. La elusión se colectó en 10 alícuotas de 1 mL y posteriormente se lavó la columna con 5 mL de imidazol 1M para lavar restos de proteína recombinante. Se utilizó dos veces cada columna antes de su regeneración para evitar contaminación entre variantes peptídicas. Las eluciones fueron analizadas en geles de acrilamida al 15% SDS-PAGE

7.2.5 Reducción de péptidos de fusión.

Los péptidos de fusión se redujeron con 100 mM de DTT por 30 min a temperatura ambiente y se purificaron por HPLC de fase reversa, usando como solvente A) 0.1 % de TFA en agua y solvente B) 0.1% TFA en acetonitrilo, usando un gradiente de 20 a 60% de solvente B en un tiempo de 40 min con un flujo de 1 mL/min. Los registros de los cromatogramas se hicieron usando longitudes de onda de 230 nm.

7.2.6 Plegamiento de péptidos de fusión reducidos.

Los péptidos de fusión reducidos con DTT y purificados por HPLC se secaron en una centrífuga de secado por vacío Savant y se sometieron a condiciones de plegamiento: Cloruro de guanidinio 2 M, Tris 50 mM pH 8, GSH:GSSG 1 mM:0.1 mM, 100 µg de proteína/mL, la mezcla de reacción se mantuvo a 4°C durante 24 h antes de analizar nuevamente por HPLC de fase reversa de acuerdo con Estrada y cols. (2007) [8].

7.2.7 Espectroscopia de masas

Las masas moleculares de los péptidos reducidos y plegados se determinaron en el equipo Electrospray/ESI/MS Fleet de Thermo Scientific con la ayuda del Dr. Fernando Zamudio en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

7.2.8 Ensayos de toxicidad en ratones CD1: Administración intracraneal

Las pruebas de toxicidad se realizaron vía intracraneal (IC) en ratones de la cepa CD1 de aproximadamente 20 g de peso, los ratones se anestesiaron con éter etílico dentro de una cámara (para facilitar el procedimiento). Se administró por separado 300 ng (4LD₅₀) de cada péptido de fusión disuelto en PBS con un volumen final de 2.5 µL. El ensayo fue realizado con una microjeringa Hamilton de 10µL que presenta un capilar de plástico sobre la aguja para exponer únicamente 3 mm de esta. Los ratones se colocaron sobre una superficie plana y la aguja se introdujo en el centro de la cabeza, a la altura intermedia entre el ojo y la oreja. Se administró un volumen final de 2.5 µL usando PBS como control negativo. Se observó el comportamiento de los organismos 2 h post-inyección. Todos los ensayos se realizaron por triplicado a excepción de la variante HisrCsslI-RCR

7.2.9 Ensayos electrofisiológicos

Los ensayos electrofisiológicos se realizaron en células de Ovario de Hámster Chino (CHO) que expresan de manera estable del hNav1.7 y células de riñón de embrión humano (HEK) HEK293 que expresan de manera estable el hNav1.6. Estas líneas celulares fueron donadas por la Dra. Rita Restano del IBT-UNAM. La solución extracelular contenía (mM): NaCl 130, KCl 5, MgCl₂ 2, HEPES 10, D-glucosa 5, pH 7.4. La solución estándar de la pipeta contenía (mM): N-metil-D-glucosamina 195, NaCl 10, MgCl₂ 2, EGTA 5, HEPES 10, pH 7.3. Los ensayos electrofisiológicos se realizaron utilizando la técnica de Patch-clamp en la configuración célula completa (Ver Figura 10A) usando un MultiClamp 700B y el software Clamp10. Las pipetas tuvieron resistencias de 3-5 Ω . Las corrientes se obtuvieron mediante un protocolo despolarizante, iniciando con un pre-pulso de 50 mV, seguidos de una serie de voltajes que van de -100 mV a +20 mV, con incrementos de 10 mV, tal como se muestra en la Figura 10B. Se realizaron ensayos electrofisiológicos con una concentración final de 5 μ M para las toxinas probadas. Las curvas I/V fueron generadas a través de la adquisición y procesamiento de los datos utilizando el programa pClamp. Los ensayos fueron realizados con la ayuda de la Dra. Rita Restano del IBT-UNAM.

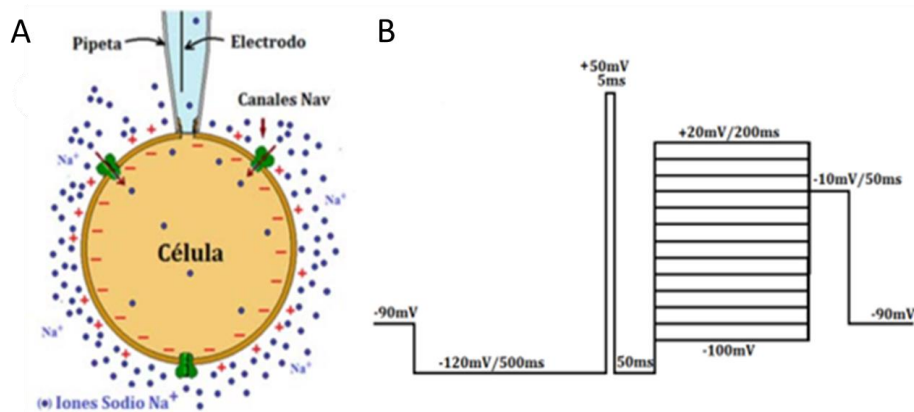


Figura 10. Ensayos electrofisiológicos en canales Nav. Esquema representativo de la técnica de Patch-clamp, configuración de célula completa (A). Protocolo de activación utilizado para los canales de sodio (B).

7.2.10 Ensayos de nocicepción de variantes peptídicas

7.2.10.1 Ensayos de mecanocicepción de variantes de la HisrCssl-RCR

Los ensayos de nocicepción fueron realizados con ratones de biotipo cepa CD1 siguiendo los protocolos del comité de bioética. Los animales fueron acondicionados 2 días antes de las pruebas de nocicepción en cajas individuales a 22°C con ciclos de luz/oscuridad de 12 h. Estos fueron asignados aleatoriamente a cada uno de los grupos experimentales (n=6): grupo control negativo (Solución salina), control positivo de analgesia y variantes peptídicas (300 ng). Cada ratón fue anestesiado previo a la administración intratecal de cada fármaco, recibiendo un volumen total de 10 μ l. Una vez recuperados de la anestesia, se midió la respuesta al retiro de la pata posterior a la aplicación de un estímulo doloroso mecánico cada 15, 30, 60 y 120 min. Se midió la latencia de retiro antes de la administración de cada fármaco para determinar el umbral nociceptivo [94]. Todos los ensayos fueron realizados por el Dr. Francisco Mercado del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramon de la Fuente Muñiz

7.2.10.2 Inducción de modelo de dolor inflamatorio

Se administró Adyuvante Completo de Freund (ACF; 1:1 en solución salina) para inducir el modelo inflamatorio a través de su inyección intraplantar en la pata derecha de cada ratón (N=6 por grupo). El adyuvante consiste en una suspensión oleosa (aceite mineral) de membranas completas o pulverizadas inactivadas por choque térmico de Mycobacteria, las cuales producen la activación sostenida del sistema inmune innato de manera local. Después de 3 h se evaluó el efecto de los péptidos a través de ensayos de mecanocicepción descritos anteriormente (Ver sección 7.2.10.1). Solamente se incluyeron a los individuos que presentaron una disminución mayor al 40% con respecto a las latencias basales.

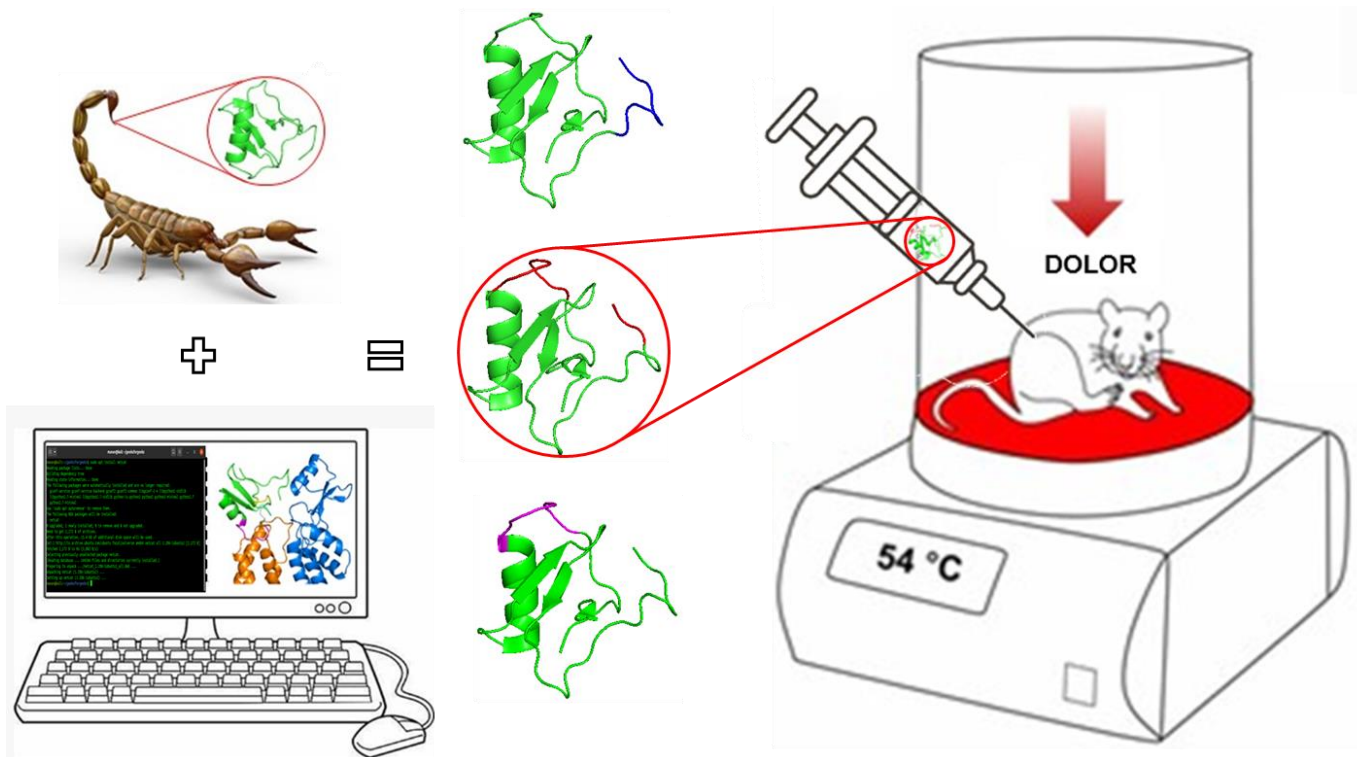
7.2.10.3 Inducción de modelo de dolor neuropático

Se utilizó el modelo de lesión generalizada del nervio ciático (SNI, por sus siglas en inglés, *spread nerve injury*, para inducir un modelo de dolor neuropático. Los ratones (n=6 por grupo) fueron anestesiados con isoflurano (2% y 98% oxígeno medicinal). Posteriormente se rasuró la pata derecha donde se realizó una incisión de 5 mm en la piel y subsecuentemente una disección roma del bíceps femoris para exponer el nervio ciático. Una vez expuesto se realizaron cortes de la rama tibial y peronea. La herida fue suturada con 2 puntos simples hechas con hilo de ácido poliglicólico 3-0 y los ratones se aislaron de manera independiente para su posterior recuperación. Finalmente 14 días después de la inducción se llevaron a cabo las pruebas conductuales de nocicepción descritas anteriormente (ver sección 7.2.10.1).

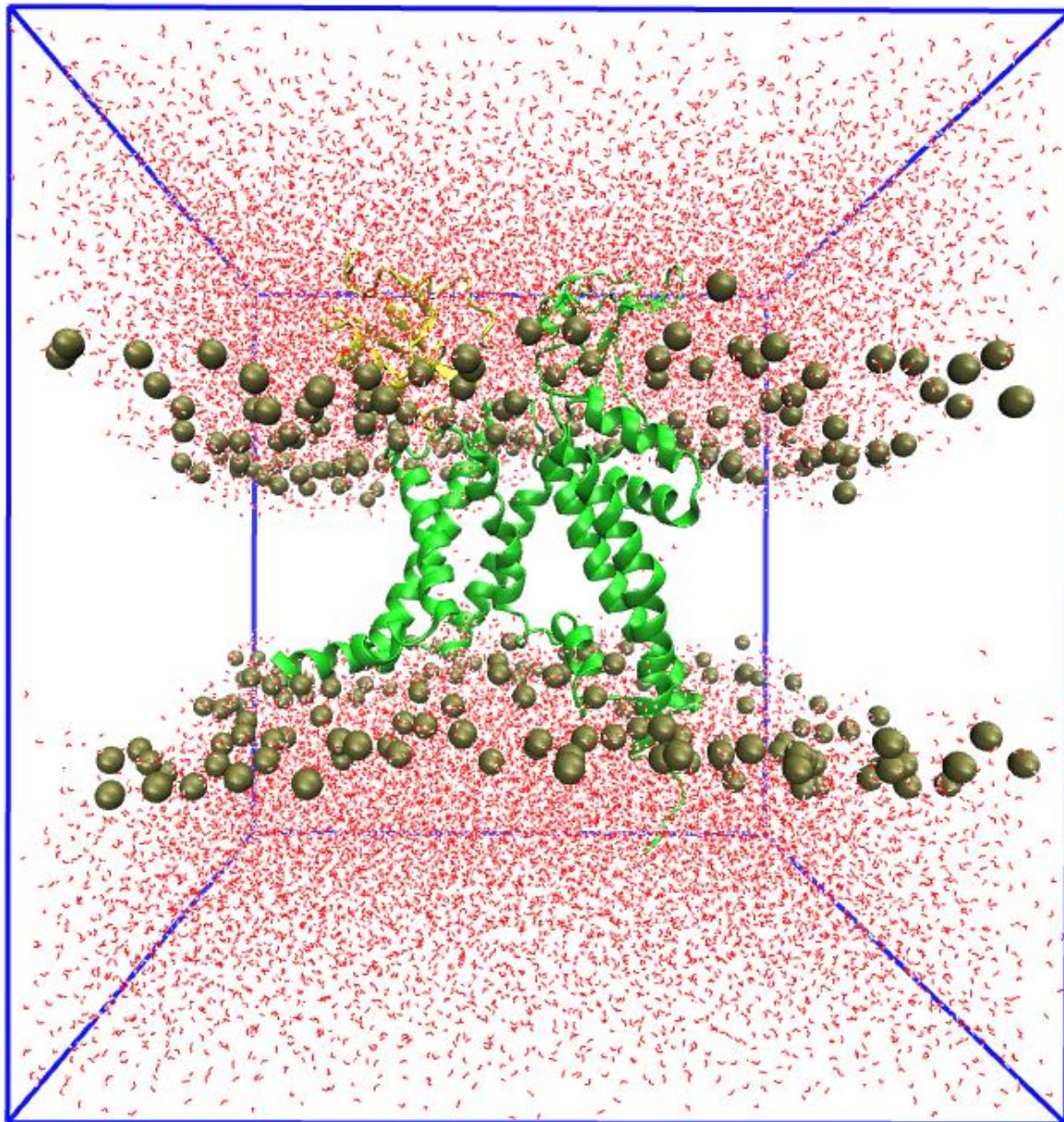
7.2.10.4 Análisis de datos

Las latencias de reflejo flexor están expresadas en segundos. Los datos están presentados como la media \pm desviación estándar. Estos datos fueron posteriormente normalizados para las curvas dosis respuesta y análisis de efecto máximo. La normalización consiste en utilizar los valores de latencia basales como el factor de normalización (obtenidos en animal intacto en modelo de dolor nociceptivo, y antes de la administración de ACF y de la cirugía en los modelos de dolor inflamatorio y neuropático, respectivamente) la cual se tomó como el 100% de efecto para cada serie experimental. Se utilizó ANOVA de dos vías para realizar comparaciones de grupos y la prueba *post hoc* de Dunnett para obtener significancia entre grupos. Las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIONES



RESULTADOS COMPUTACIONALES



8 Resultados y discusión.

8.1 Resultados computacionales.

8.1.1 Obtención de estructuras tridimensionales de β -neurotoxinas.

Se utilizaron las estructuras más representativas, reportadas por cada archivo de coordenadas PDB como el número uno en ambos casos, obtenidas por RMN de los toxinas nCsslI (PDB ID: 2LI7) y HisrCsslI (PDB ID: 2LJM), para su comparación estructural [51]. Debido a que el péptido HisrCsslI es el homólogo recombinante de nCsslI, siendo la principal diferencia entre ambas estructuras la cola de HIS y la amidación del C terminal, se analizó si ambas estructuras presentaban un plegamiento diferente. Para ello se utilizó la métrica del RMSD (del inglés *Root mean square deviation*) para conocer si existe diferencia estructural entre ambos modelos (RMSD $>3\text{\AA}$ considerado como diferencia estructural). Se observó que ambas estructuras presentaron un RMSD de 2.35\AA de cadena principal, concluyendo que los dos modelos presentan un estructura tridimensional semejante (Ver Figura 11). Esto último es importante debido a que la fuente de cada péptido fue distinta, previa a la determinación estructural por RMN. Siendo la toxina nCsslI purificada del veneno completo mientras la HisrCsslI fue obtenida mediante expresión heteróloga en *E. coli*. Por otro lado, el péptido rCsslI-RCR al ser generado por una mutación *in-silico*, únicamente sustitución de la cadena lateral presentó un RMSD igual a cero.

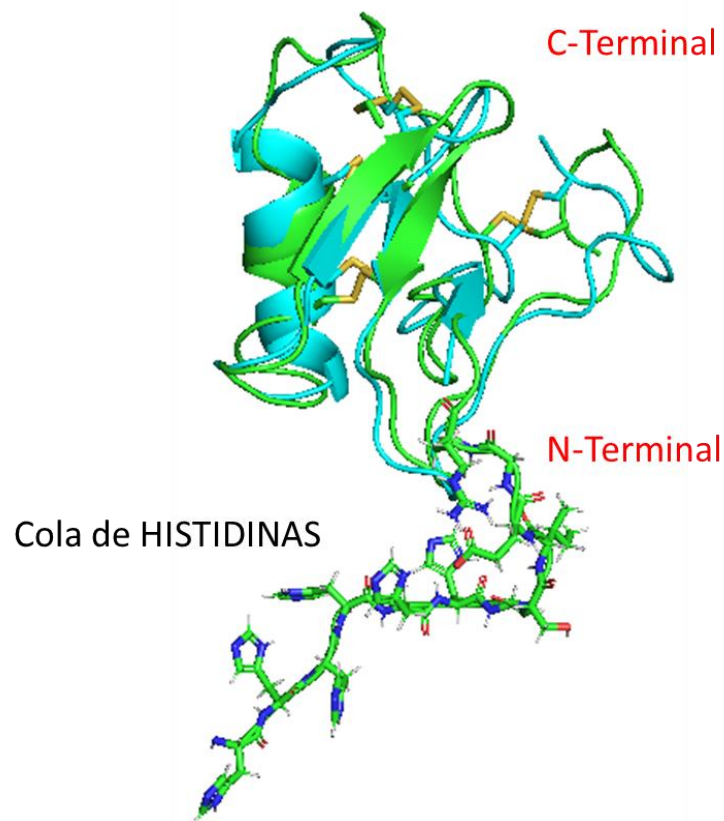


Figura 11. Alineamiento estructural de β -neurotoxinas de alacrán del género *Centruroides*. Toxina nCsslI (Cyan) péptido recombinante HisrCsslI (Verde). Cola de histidinas del péptido HisrCsslI y puentes disulfuro representado en palos y bolas.

Pese a que la toxina Cell8 presenta una identidad de secuencia (IDS) en el límite para considerar un parentesco evolutivo con la nCsslI (IDS: 33 %), se consideró al péptido Cell8 como homólogo a nCsslI [61]. Esta decisión fue basada en el hecho que Cell8 genera efectos tipo β sobre el canal Nav1.7, relacionando la estructura de las β -neurotoxinas con su función [12]. Por otra parte, las CYS son un motivo estructural importante que da estabilidad al plegamiento de las β -toxinas de alacrán, esto a través de la formación de puentes disulfuro, siendo la posición de estos aminoácidos conservado en el alineamiento. A pesar de ello, se utilizó la técnica de reconocimiento de plegamiento, (*Threading modeling* en inglés) mediante la implementación del programa I-Tasser, para determinar la estructura tridimensional del péptido Cell8. Este algoritmo es de utilidad cuando la incertidumbre de parentesco evolutivo, relación de tamaño de secuencia y IDS, es alta, presentando este software una herramienta ideal para generar la estructura tridimensional. El modelo generado por I-Tasser presentó una puntuación C y TM con un valor de -0.92 y 0.47 respectivamente, siendo estos parámetros de confianza apropiados para darle validez al modelo generado (puntuación C entre -5 y 2 y TM entre 0 y 1). El modelo de la toxina Cell8 presentó un RMSD de 2.89 Å de cadena principal con respecto a nCsslI, concluyendo que ambas estructuras presentan el mismo plegamiento. Como era de esperarse Cell8 exhibió el mismo patrón de puentes disulfuro que la toxina nCsslI, observando que la principal diferencia se localizó en el C-terminal. Esto debido a que el péptido Cell8 presenta una secuencia extra de 4 aminoácidos después del último puente disulfuro, siendo la resolución del programa para esta región en la formación de una pequeña hélice α (Ver figura 12). Esta α -hélice, en el C-terminal, podría estar involucrada en interacciones importantes con el canal hNav1.7. Sin embargo, debido al bajo número de estructuras resueltas experimentalmente, correspondiente a β -neurotoxinas de alacrán, se desconoce si esta pequeña estructura en el C-terminal tiene relevancia biológica o representa un artefacto del programa.

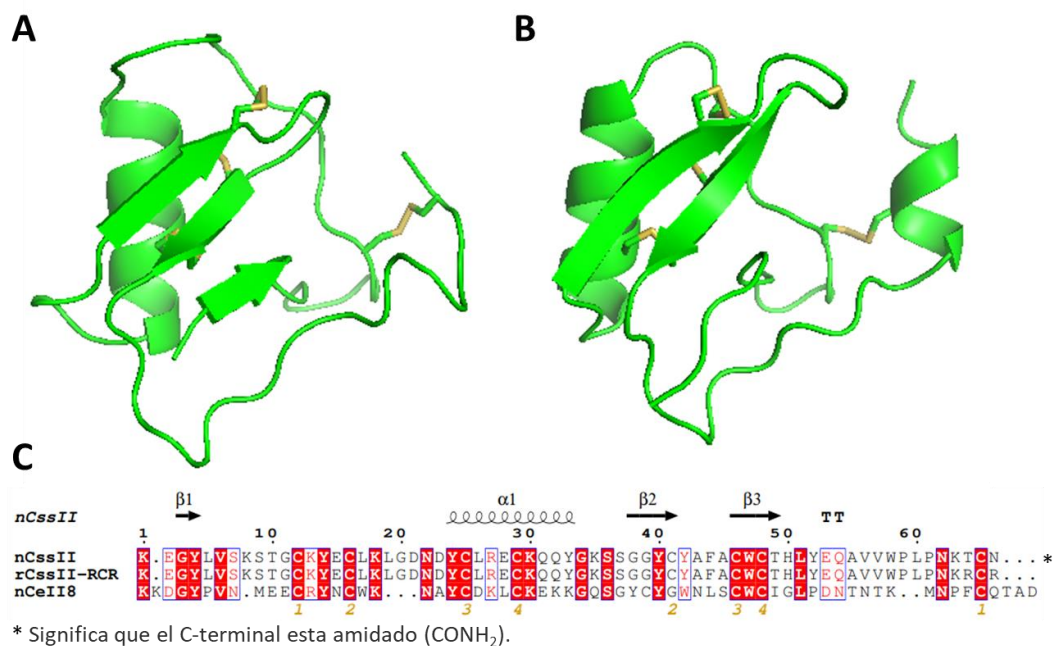


Figura 12. Estructuras tridimensionales y alineamiento de secuencias pertenecientes a β -neurotoxinas de alacrán del género *Centruroides*. Toxina nCsslI (A). Toxina Cell8 (B). Alineamiento de secuencias de β -neurotoxinas de alacrán del género *Centruroides* (C).

A pesar de que la fecha en la que se realizó esta parte del proyecto no se encontraba liberado el código de AlphaFold-colab, se decidió utilizar este algoritmo posterior al análisis de este trabajo para realizar el modelado del péptido Cell8. El modelo generado por Alpha Fold exhibió la misma estructura tridimensional a la generada por I-Tasser, exhibiendo un RMSD de 0.7 Å de cadena principal entre ambos modelos, mejorando con esto la fiabilidad de nuestro primer modelo generado.

8.1.2 Análisis estructural de los sDSV del canal hNav1.7

A pesar de que el modelo del canal hNav1.7 (PDB ID: 6J8J) exhibió una resolución elevada de 3.2 Å, límite máximo para modelado por homología 3.5 Å, esta estructura mostró una densidad electrónica variable a lo largo de su estructura. Siendo las regiones más cercanas a la membrana y al solvente las que presentan menor resolución. Sin embargo, se observó que la densidad electrónica justificó la cadena principal del 97% del modelo, mostrando a regiones como el sDSV-II donde la densidad electrónica sustentó las cadenas laterales de los aminoácidos (Ver figura 13A). Esto último fue de vital interés debido a que las β -neurotoxinas presentan su actividad posterior a una hiper despolarización del canal, siendo este estado conformacional importante generar los modelos de interacción. Aunque estructuralmente no se tiene un consenso sobre un modelo de canal que represente cada uno de los diferentes estados cinéticos de los Nav, se ha determinado estructuras que presentan al sDSV en una condición presuntamente despolarizada. Este estado está determinado por la conformación del sensor de voltaje (S4), el cual se exhibe como una hélice 3-10 expuesta al medio extracelular, cuyos residuos presentan interacción con otras regiones del mismo sDSV como lo es el segmento S2. Particularmente esta configuración presenta a los residuos cargados positivamente, denominadas cargas de apertura (CA), del S4 interactuando con un motivo localizado en S2 conocido como centro de transferencia de carga (CTC). Este motivo está conformado por tres residuos (elementos) separados a lo largo de S2 como lo es An1 (ASN), un residuo aromático (PHE o TYR) y An2 (GLU). Se hipotetiza que el estado despolarizado de los sDSV en los canales Nav está dado cuando las primeras CA, de R1 a R2, se posicionan por encima del motivo An2. Observando al residuo R3 interactuando con An1, mientras que el resto de CA se sitúan cercanas a el residuo aromático y al elemento An2 (Ver figura 13B) [62]. Esta conformación es diferente de la configuración de las CA respecto al CTC del sDSV-II de un canal en estado inactivo, como se observa en la figura 13C para el sDSV-II del hNav1.7 [63]. Todos los sDSV del hNav1.7 (PDB ID: 6J8J) presentaron diferentes estados de despolarización, sin embargo, el sDSV-II mostró un estado completamente despolarizado, siendo esto último justificado por densidad electrónica (Ver figura 13A). Así mismo este sDSV-II exhibió al S4 en un estado de mayor despolarización respecto a la figura 13B, observando a las CA de R2 y R3 localizarse por encima de An1 y R4 en interacción interactuando con este primer elemento (Ver figura 13A). Esta disposición de las CA en el canal hNav1.7, principalmente en el sDSV-II, respecto al CTC del S2, fue importante para asegurar el estado despolarizado de la estructura modelada del canal hNav1.6 (Ver figura 13B). Pudiendo esta estructura ser la representación de un estado hiperdespolarizado, el cual es un requisito importante para generar el efecto β característico de estas toxinas [5]. Concluyendo que el modelo del hNav1.7 (PDB ID: 6J8J) es un candidato apropiado para generar su uso como plantilla para el modelado, permitiendo el uso de esta estructura obtener un modelo del hNav1.6 con características conformacionales similares a las exhibidas en los sDSV del canal hNav1.7.

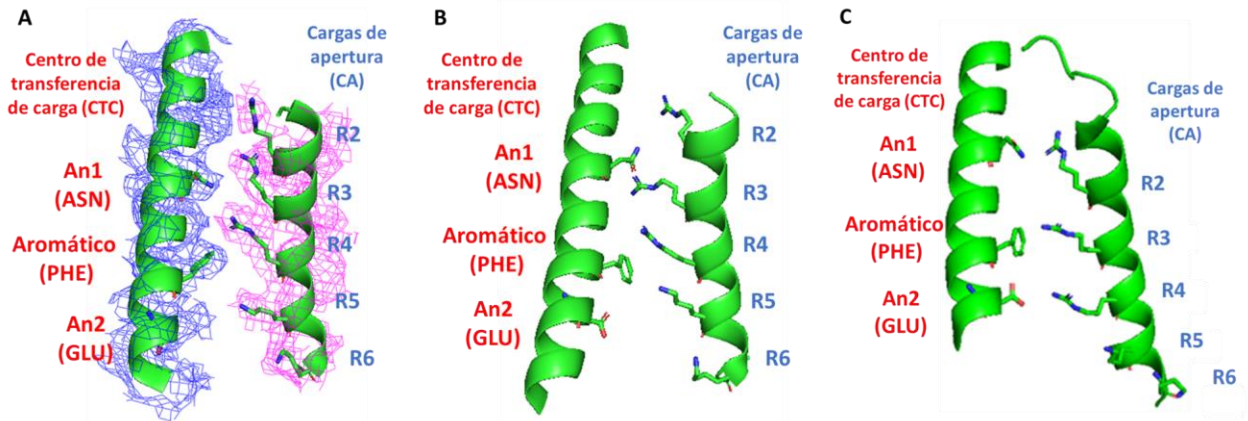


Figura 13. Disposición de cargas de apertura (CA) del sensor de voltaje (S4) respecto al centro de transferencia de carga (CTC) del segmento dos (S2) de los sDSV-II de diferentes canales Nav. S2 y S4 del sDSV-II del canal hNav1.7 (PDB ID: 6J8J) (A). S2 y S4 del sDSV-II del canal hNav1.4 (PDB ID: 6AGF) (B). S2 y S4 del sDSV-II del canal hNav1.7 (PDB ID: 64NR) (C).

8.1.3 Modelado molecular del canal hNav1.6

Todos los modelos generados para el canal hNav1.6 presentaron un RMSD aceptable, en el rango de 2-2.8 Å (límite máximo 3Å), seleccionando al modelo de la zona más poblada que presenta las mejores puntuaciones de calidad estructural para la cadena principal (Ver figuras 14A y 14B). Se observó que el modelo seleccionado presentó un 93% (calidad estructural apropiada $\geq 90\%$) de los residuos en regiones favorables (ángulos diedros ϕ y ψ), observando que el resto de aminoácidos se localizó en regiones conectoras intra y extracelulares. Posteriormente a la selección del modelo, se truncó la estructura de canal manteniendo únicamente el sitio 4 de unión de β -neurotoxinas (Ver figura 15A y 15B). Todos los sDSV del canal hNav1.6 exhibieron una configuración despolarizada, presentando el sDSV-II una configuración similar al del canal hNav1.7, esto último adecuado para los fines del proyecto (Ver figura 15C).

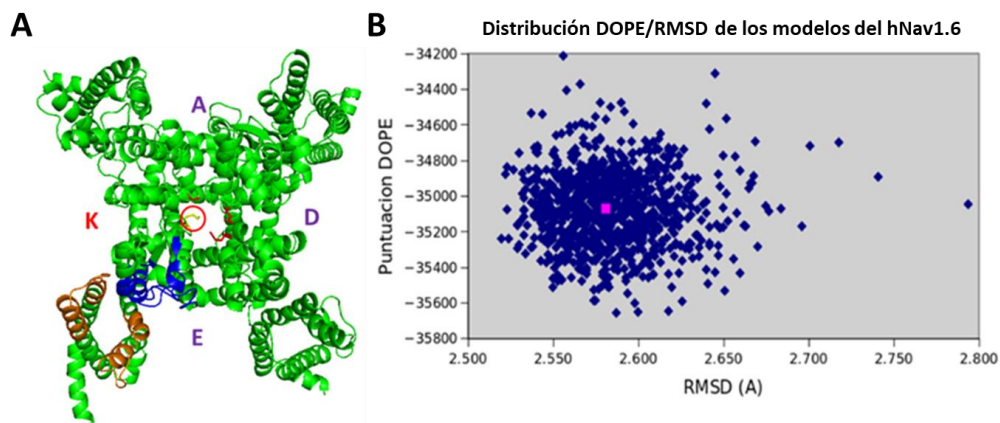


Figura 14. Modelado molecular del canal hNav1.6. Estructura tridimensional del canal hNav1.6 (A). Residuos formadores del filtro de selectividad del poro D_(ASP) E_(GLU) K_(LYS) A_(ALA) representados en palos y bolas. Distribución DOPE/RMSD de los 10,000 modelos generados por modelado por homología para el canal hNav1.6. Zona de selección del modelo marcada como punto rosa. Zonas de interacción para β -neurotoxinas coloreadas de naranja y azul en el modelo del canal hNAV1.6.

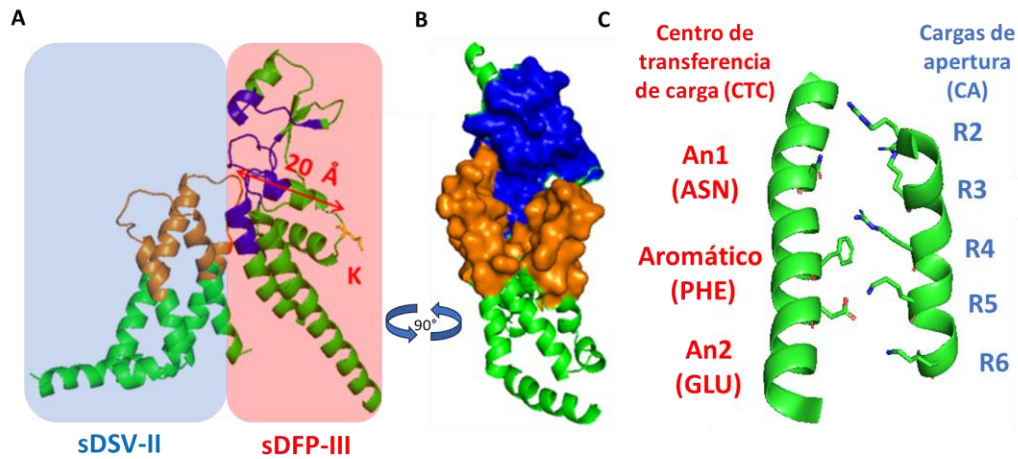


Figura 15. Sitio 4 de unión a β -neurotoxinas del canal hNav1.6. Vista lateral al sDSV-II (región en cuadro transparente azul) y el sDFP-III (Región en cuadro transparente rojo) del canal hNav1.6 (A). Vista frontal al sDFP-III con zonas de unión a β -neurotoxinas representada en superficie accesible al solvente (B). Disposición de cargas de apertura (CA) del sensor de voltaje (S4) respecto al centro de transferencia de carga (CTC) del segmento dos (S2) del sDSV-II del hNAV1.6 (C). Regiones propuestas de unión de β -neurotoxinas coloreadas de naranja y azul.

8.1.4 Dinámica molecular del canal hNav1.6

Para analizar el efecto de utilizar el canal completo o solo el sitio 4 de interés, se realizaron simulaciones de dinámica molecular para la subunidad α del canal hNav1.6 en una membrana formada por una mezcla compleja de lípidos (Anexo I) [56] y una con el sitio 4 de unión a β -neurotoxinas embebida en una membrana modelo de POPC (Ver figura 16).

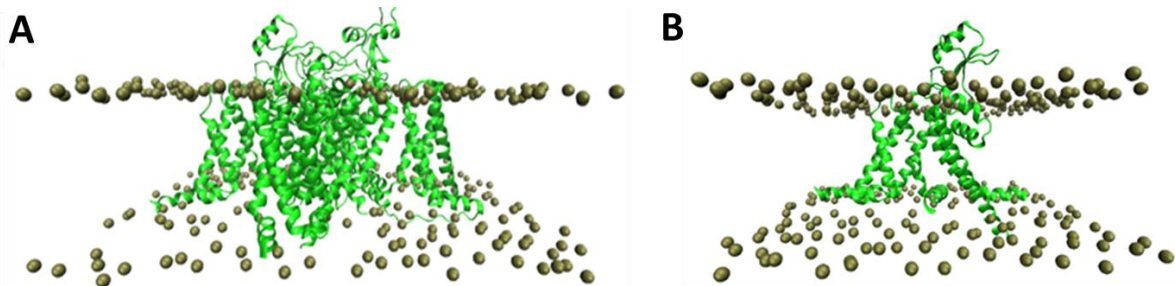


Figura 16. Distintas configuraciones simuladas proteína/membrana para el canal hNav1.6. Subunidad α del canal hNav1.6 en una membrana compleja (A). Sitio 4 de unión a β -neurotoxinas del canal hNav1.6 en una membrana de POPC(B)

Se tomaron las cinco estructuras más representativas de cada simulación (centroides) y se compararon entre ellas a través de una matriz de RMSD de cadena principal. A pesar de existir una diferencia en RMSD entre el uso de la subunidad- α /membrana compleja (MIX) y el sitio 4 del hNav1.6/membrana de POPC, el RMSD de todas las comparaciones fue menor a 3 Å (Ver figura 17A). Siendo las regiones con mayor diferencia en RMSD aquellas localizadas en la región extracelular de la proteína (Ver figura 16B). Esto último esperado, debido a que las regiones expuestas al solvente presentan mayor índice de movilidad, respecto a las regiones transmembranales, las cuales no presentaron cambios conformacionales drásticos en ninguna de los centroides.

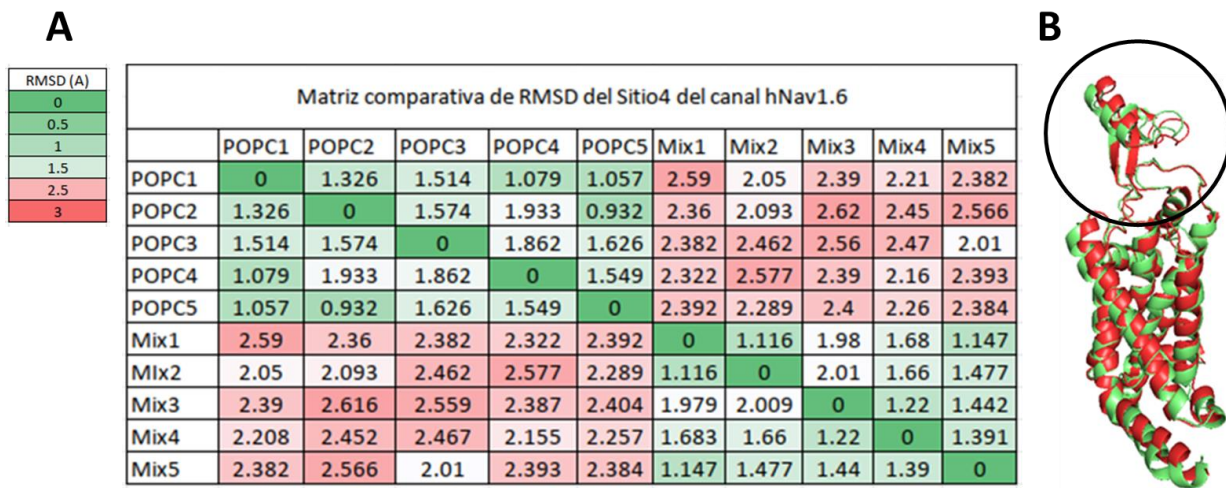


Figura 17. Matriz de alineamiento de estructuras representativas del sitio 4 del hNav1.6 en los sistemas proteína/membrana simulados. Diferencia estructural entre los sitios de unión a β -neurotoxinas en los sistemas sitio 4 del hNav1.6/POPC (POPC) vs subunidad α /membrana compleja (MIX) (A). Alineamiento estructural entre los sitios de unión a β -neurotoxinas en los sistemas sitio 4 del hNav1.6/POPC (POPC) vs subunidad α /membrana compleja (MIX) (B).

Debido a esto se concluyó que no existe diferencia estructural entre utilizar el sitio 4 del hNav1.6 en una bicapa de POPC, respecto a uso de la subunidad α en membrana compleja. Por otro lado, ya que los tiempos de simulación que se planean explorar, para la interacción péptido/receptor, se encuentran en el orden de nanosegundos, se evitan cambios conformacionales que afecten la interacción de la toxina con el sitio 4 del hNav1.6.

8.1.5 Análisis de la superficie electrostática de β -neurotoxinas y canales Nav's

Todos los sistemas, tanto las toxinas como los receptores, mostraron un estado estable (baja variación estructural en función del tiempo) después de completar el primer tercio de cada simulación (Ver Figura 18). Esto último observando un valor de desviación estándar, para cada sistema en estado estable, de un orden de magnitud menor respecto promedio de RMSD para cada caso. Se seleccionó una estructura representativa, de cada zona estable, para el posterior análisis de la superficie eléctrica de cada toxina y su respectivo receptor.

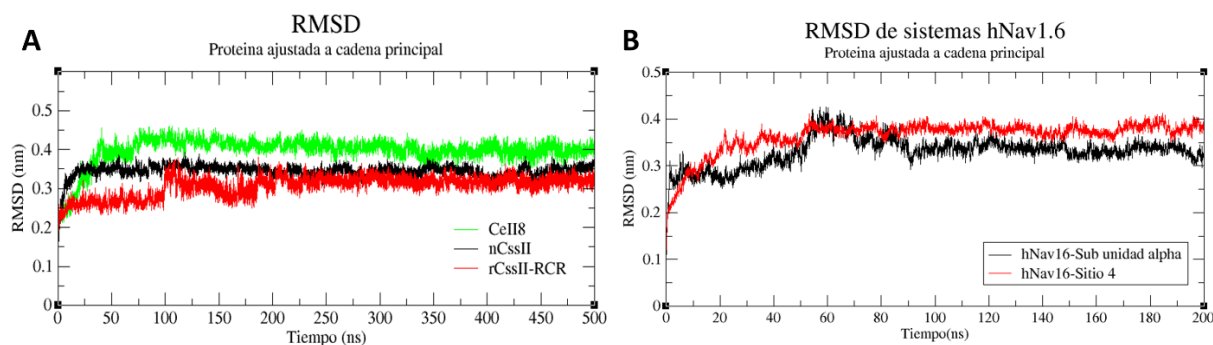


Figura 18. RMSD de cadena principal con respecto al tiempo para todos los sistemas simulados. Trayectoria para las toxinas nCell8 (verde), nCsslI (negro) y rCsslI-RCR (rojo) (A). Trayectoria para el sitio 4 de unión a β -neurotoxinas de los canales hNav1.6.

Los mapas de potencial electrostático calculados para las β -neurotoxinas, mostradas en la figura 17, revelan una importante superficie cargada situada en el C-terminal de cada una de las estructuras (Ver figura 19). Por un lado, la rCsslI presentó una distribución de carga negativa contrastante con las toxinas nCsslI y rCsslI-RCR, estas últimas activas sobre el hNav1.6. Este fenómeno eléctrico fue asociado a la exposición del carboxilo terminal al medio extracelular (Ver figura 19A y 19B). Por otro lado, la variante rCsslI-RCR presentó una distribución de carga, en el C-terminal, parecida al de la toxina amidada nCsslI (Ver figuras 19C a la 19F). Esta similitud fue producida por la formación de un enlace salino intracadena por parte del residuo R64 con el grupo carboxilo terminal de la misma toxina rCsslI-RCR (Ver figura 19F y 19I). Esta frecuente interacción, observada durante casi 500 ns de simulación, permitió la neutralización del C-terminal obteniendo una superficie eléctrica similar al de la amidación en nCsslI (Ver figuras 19C Y 19E). Este resultado posibilitó esclarecer, a nivel molecular, el efecto de los residuos cargados en la electrostática del C-terminal para variante rCsslI-RCR.

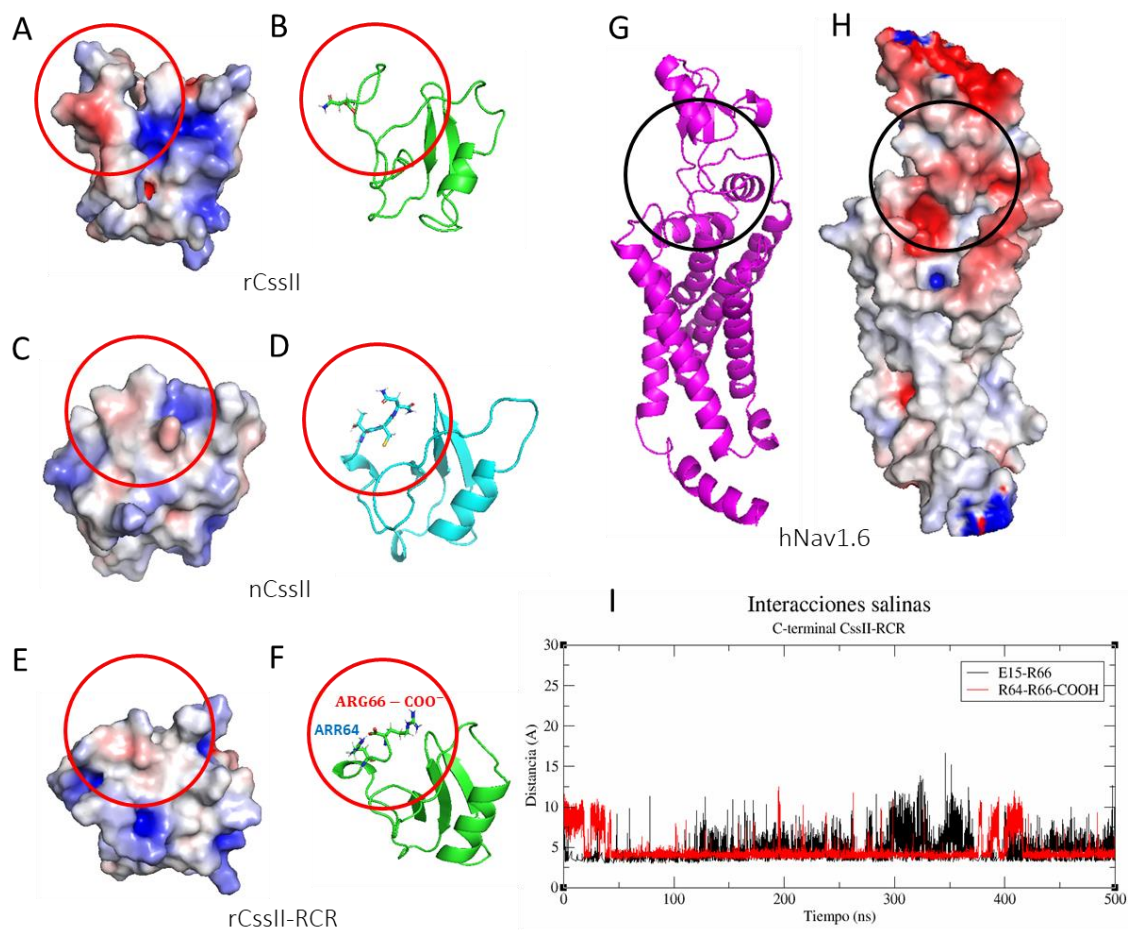


Figura 19. Estructuras y mapas de potencial electrostático para β -neurotoxinas del género *Centruroides* y el sitio 4 del canal hNav1.6. Toxina rCsslI (A y B), Toxina nCsslI (C y D), toxina rCsslI-RCR (E y F). Sitio de 4 del canal hNav1.6 (G y H). Interacciones iónicas intracadena de la toxina rCsslI-RCR (I). Regiones correspondientes al C-terminal de las β -neurotoxinas rCsslI, nCsslI y nCsslI-RCR marcadas con círculos rojos. Regiones correspondientes al subdominio formador del poro III del canal hNav1.6 marcado con círculos negros.

Por otra parte, se observó que la distribución de carga en la superficie correspondiente al dominio formador del poro III (sDFP-III) del canal hNav1.6 exhibió una carga negativa (Ver figura 19G y 19H). Debido a esto, se hipotetiza que la carga electrostática del C-terminal para el caso de la recombinante de CsslI (rCsslI) puede estar impidiendo el correcto acoplamiento de la toxina a través de un efecto de repulsión electrostática con el sDFP-III. Siendo este fenómeno eléctrico una posible explicación de la diferencia de afinidades exhibida por parte del péptido rCsslI respecto a las toxinas nCsslI y rCsslI-RCR en el estudio de Estrada y colaboradores [10,11]. Debido a los fenómenos electrostáticos exhibidos por parte de estas β -neurotoxinas y el sitio 4 del canal hNav1.6, se sugiere que la carga electrostática del C-terminal podrían ser un elemento clave para la interacción de las β -neurotoxinas con los canales Nav's. En contraste, la superficie de potencial electrostático de la toxina Cell8 exhibió una distribución de carga negativa en la región correspondiente al C-terminal (Ver figura 20 A y 20B). Siendo este fenómeno eléctrico favorecido por la ausencia de amidación, así como la presencia de un aminoácido cargado negativamente (ASP) al final de la secuencia de Cell8 (Ver figura 19B). Estas características exhibidas por la toxina Cell8, como lo es la ausencia de amidación y la presencia de un residuo aniónico en el C-terminal, contrasta con todos los reportes existentes de β -neurotoxinas de alacrán del género *Centruroides* [6]. Sin embargo, esta manifestación eléctrica exhibida por la toxina Cell8 pudo correlacionarse con la distribución de carga del sDFP-III del canal hNav1.7 (Ver figura 20C y 20D). Bajo el supuesto que el potencial eléctrico del C-terminal es un componente clave para la unión de las β -neurotoxinas con hNav's, hipotetizamos que la carga negativa en el C-terminal de Cell8 podría favorecer la unión por parte de la toxina con el sitio 4 del canal hNav1.7.

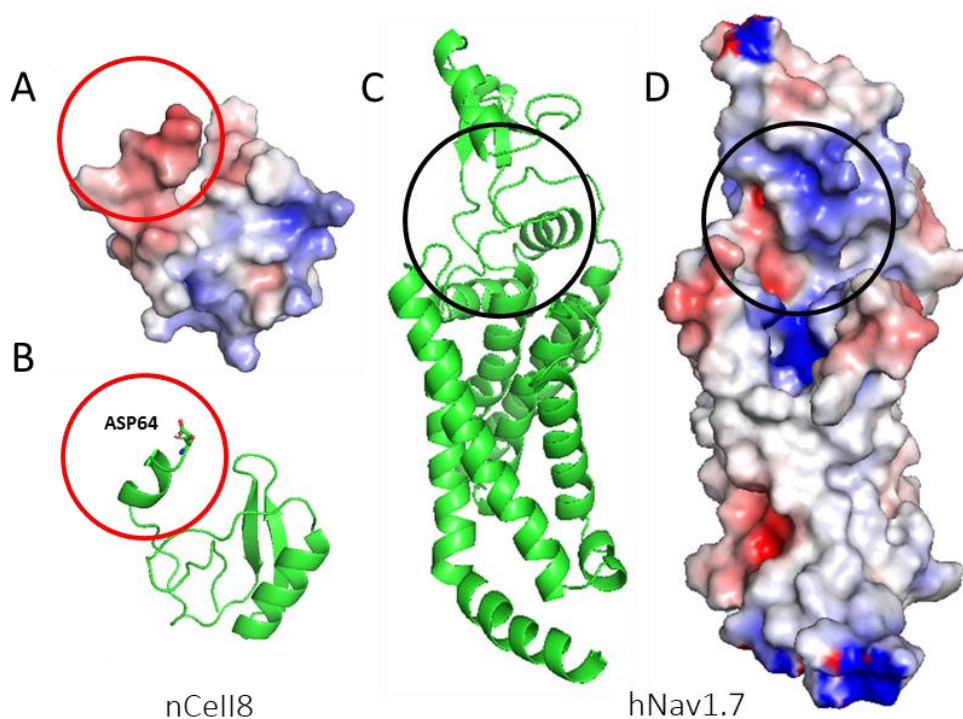


Figura 20. Estructuras y mapas de potencial electrostático para la β -neurotoxina del género *Centruroides* Cell8 y el sitio 4 del canal hNav1.7. Toxina Cell8 (A y B). Sitio de 4 del canal hNav1.7 (C y D). Regiones correspondientes al C-terminal de la toxina Cell8 marcadas con círculos rojos. Regiones correspondientes al subdominio formador del poro III del canal hNav1.7 marcado con círculos negros.

8.1.6 Acoplamiento molecular de β -neurotoxinas sobre el sitio 4 de Nav1.6

Se seleccionaron todos los acoplamientos que representarán la mayor cantidad de información experimental existente, mostrando estos últimos una interfaz toxina-receptor de 1800-2500 Å² aproximadamente. Siendo aquellos complejos elegidos para su comprobación, por simulaciones de dinámica molecular, los que exhibieron la menor energía de unión calculada por Prodigy. Todos los complejos seleccionados exhibieron a las regiones del N-terminal (7-20), la región, el asa conectora β 2- β 3 (39-44) y al C-terminal (62-66) de las toxinas, interactuando con el sitio 4 (sDSV-II y el sDFP-III) del canal hNav1.6. Una característica resaltante en todos los modelos fue la presencia del residuo GLU15, de cada toxina, en interacción con la primera carga de apertura R2 en el dominio sensor de voltaje (Ver figura 21). Siendo este residuo reportado como importante para producir el efecto de mover los potenciales de activación a valores más negativos en la β -neurotoxina CsslV sobre el canal Nav1.2 [46]

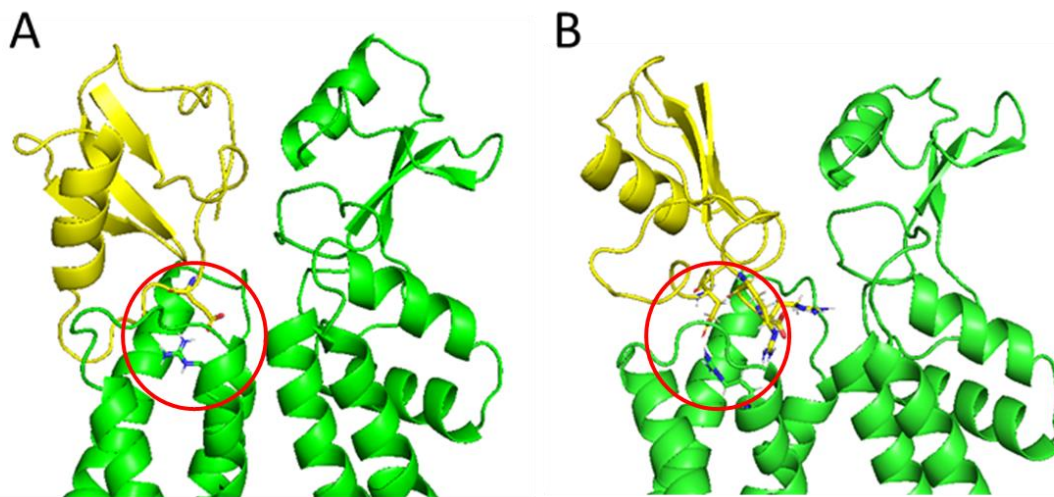


Figura 21. Acoplamientos moleculares para β -neurotoxinas de alacrán del género *Centruroides* sobre el sitio 4 del canal hNav1.6. Toxina nCsslI/receptor (A). Toxina rCsslII-RCR/receptor (B). Residuo GLU15 y carga de apertura R2 (ARG844) representados en palos y bolas. Interacción R15-R844 encerrado en círculo rojo.

8.1.7 Modelo de interacción por dinámica molecular de β -neurotoxinas sobre el sitio 4 de Nav1.6

Únicamente dos acoplamientos, uno para nCsslI y otro para rCsslII-RCR, presentaron interacción con su receptor durante las simulaciones. Estos complejos exhibieron un particular fenómeno de reacoplamiento, por parte de cada toxina, respecto a su posición inicial en el sitio 4 del canal Nav1.6 (Ver figura 22). A pesar de este suceso, ambas toxinas exhibieron formas de unión similares, exhibiendo al extremo C-terminal y al asa conectora β 2- β 3 (42-44) interactuando con el (sDFP-III) así como al N-terminal con el subdominio sensor de voltaje II (sDSV-II) (Escanear códigos QR de la figura 23A y 23B). Se observó que la distribución de contactos por parte de los residuos de la toxina nCsslI y CsslII-RCR respecto al sitio 4 del hNav1.6 fue similar, siendo la región del N-terminal la que presentó mayores diferencias (Ver figura 23C y 23D). A pesar de esto, todas las regiones de interacción, por parte de ambas toxinas, están de acorde con las zonas de importancia reportada por Cohen y colaboradores para las β -neurotoxinas del género *Centruroides* [46].

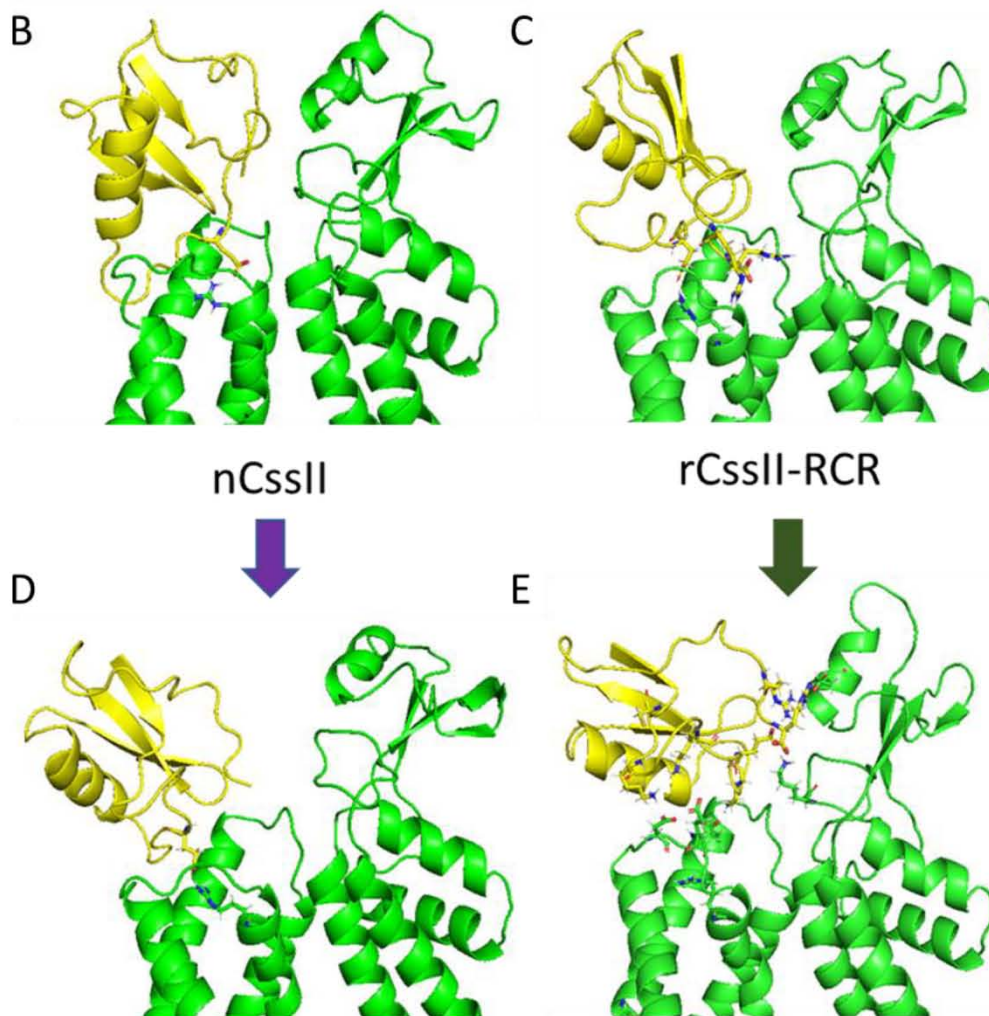
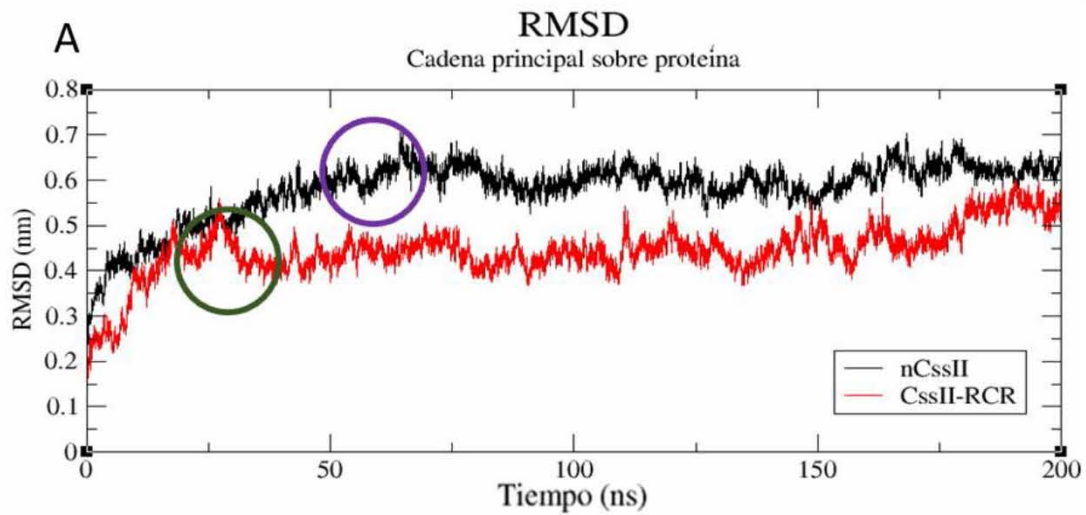
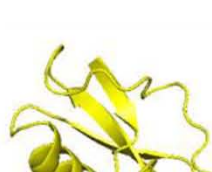


Figura 22. Acoplamiento molecular de las toxinas nCssII y rCssII-RCR. Trayectoria de los complejos toxina/receptor de los péptidos nCssII y rCssII-RCR con el sitio 4 del canal hNav1.6 (A). Intervalo de tiempo donde se produjo el fenómeno de reacoplamiento marcado con círculo morado para la toxina nCssII y verde para la toxina rCssII-RCR. Acoplamiento inicial de la toxina nCssII (B) y rCssII-RCR (C). Reacoplamiento final de la toxina nCssII (D) y rCssII-RCR (E).

A



45



B



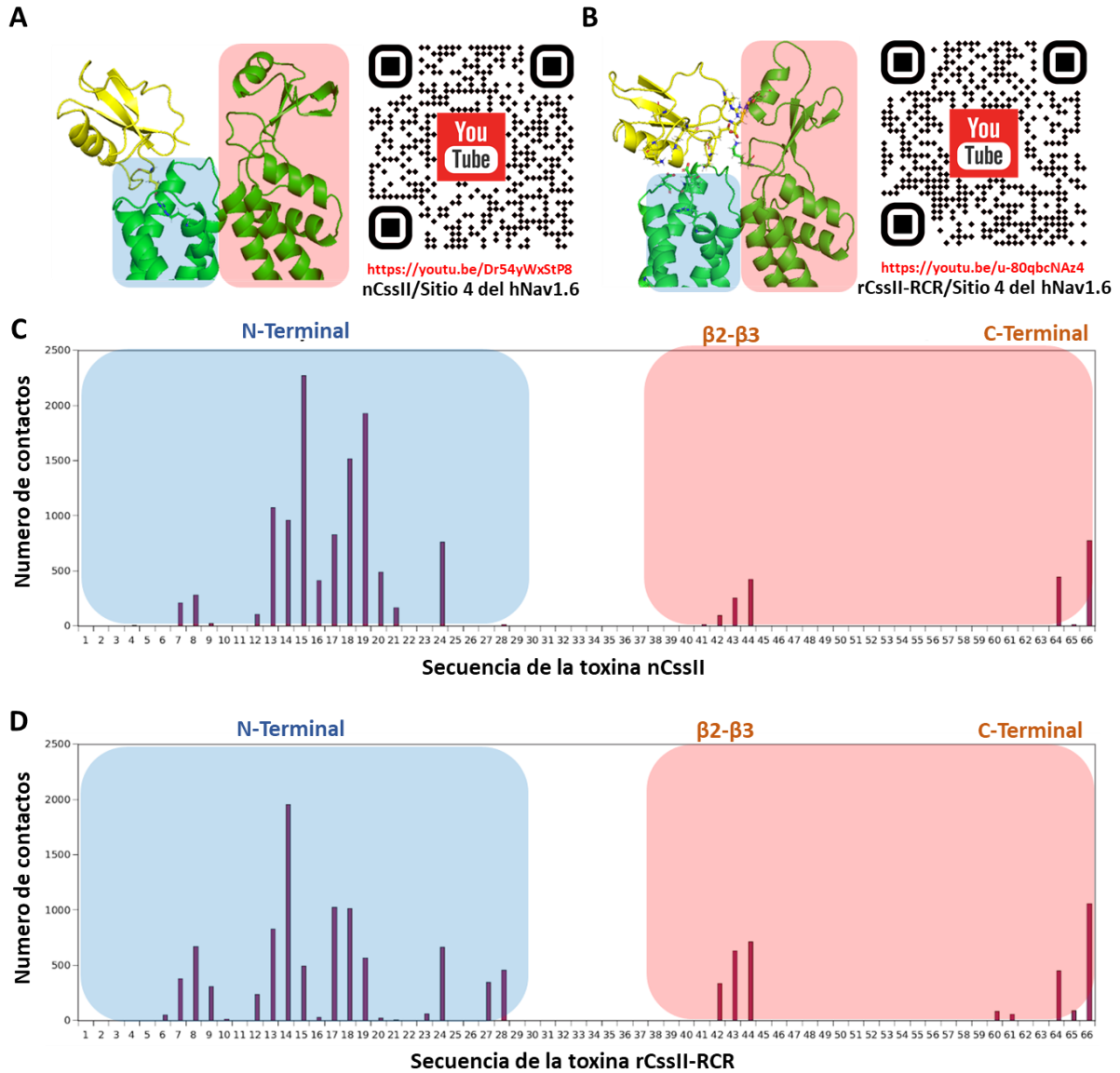


Figura 23. Modos de interacción por parte de las β -neurotoxinas nCsslI y rCsslI-RCR sobre el sitio 4 del canal hNav1.6. Modelos tridimensionales de interacción para las toxinas nCsslI (A) y rCsslI-RCR (B) sobre el sitio 4 del canal hNav1.6. Cada código QR corresponde a un video asociado al modo de interacción de las toxinas nCsslI y rCsslI-RCR sobre el sitio 4 del canal hNav1.6. Distribución del número de contactos exhibidos por las toxinas nCsslI (C) y rCsslI-RCR (D) sobre el sitio 4 del canal hNav1.6

A pesar de que los modelos de unión aquí propuestos exhibieron diferentes tipos de interacciones toxina/receptor (Ver anexo III), se utilizaron los enlaces del tipo salino para describir el fenómeno de unión de las β -neurotoxinas con el sitio 4 del hNav1.6. Este tipo de interacción tiene la característica de ser más estable respecto al resto de enlaces moleculares, esto último debido a que al ser formados por la atracción electrostática de pares iónicos, no requieren un ángulo de inclinación entre los átomos interactuantes. Esto permite comportarse de una manera más estable y exhibir una mayor energía de enlace, siendo este tipo de interacción precedida energéticamente únicamente por el enlace covalente.

Así mismo, debido al importante papel que presenta la electrostática en la unión de las β -neurotoxinas de alacrán [11,45,46,64], se decidió utilizar las interacciones del tipo iónicas para explicar el fenómeno de unión toxina/receptor. La diferencia en interacciones mostrada por la región del N-terminal de ambas toxinas fue explicada a través del particular modo de unión de estos péptidos con el sDSV-II. Una característica clave para entender esta singular forma de interacción fue a través del enlace formado por el residuo GLU15. Mientras que la toxina nCsslI presentó una interacción estable por parte de GLU15 con el residuo ARG844 del sensor de voltaje (S4), la variante rCsslI-RCR presentó a este residuo ácido unido a la LYS1427 del sDFP-III (Ver figuras 24A a la 24D). La falta del enlace GLU15-ARG844, en la variante rCsslI-RCR, fue explicada mediante el reacomodo observado por parte de toxina sobre su receptor, permitiendo este ajuste promover, durante un corto periodo de tiempo, la interacción intracadena de GLU15 con el residuo ARG66. Este enlace fue registrado frecuentemente en las simulaciones de equilibrio para la toxina rCsslI-RCR en condiciones fisiológicas (Ver figura 19I). A pesar de que el enlace GLU15-ARG66 fue recurrente en las estructuras representativas generadas por GROMACS, se seleccionó un conformero que presentará al residuo GLU15 sin interacción. Esta selección fue fundamentada en el hecho de que GLU15 es un residuo importante para generar el efecto β de mover el potencial de activación a valores más negativos. Sin embargo, se observó en nuestras simulaciones del complejo rCsslI-RCR/sitio 4 del hNav1.6 la reconstitución, por breve periodo de tiempo, del enlace GLU15-ARG66, permitiendo con ello la orientación de este residuo ácido hacia el sDFP-III. Esta nueva disposición espacial por parte de GLU15 y ARG66 permitió la formación de dos nuevas uniones como lo fueron GLU15-LYS1427 y ARG66-GLU1375 (Ver figuras 24C y 24D). Por otro lado, la dinámica molecular de la toxina nCsslI exhibió un enlace iónico distinto a los expuestos por el péptido rCsslI-RCR. Esta interacción fue generada a través de la unión del residuo ARG27 con los grupos fosfatos de la membrana, observando que después del reacomplamiento de la toxina nCsslI esta unión iónica se mantuvo estable por el resto de la simulación (Ver figura 24E y 24F). A pesar de que la existencia de reportes que aborden la unión de β -neurotoxinas asistidas por la membrana es nulo, existen otro tipo de toxinas modificadoras de la apertura que exhiben esta particularidad. Este es el caso de la Huwentoxina IV y Protoxina II, los cuales son péptidos de araña que requieren interactuar con la membrana para su posterior interacción con los dominios sensores de voltaje de los canales Nav's [63,65,66]. Esto último respalda a la teoría que este tipo de interacciones pueden formarse entre las β -neurotoxinas de alacrán con la membrana, dando fiabilidad al modo de interacción propuesto. Marcando así este modelo de interacción un hito como el primer reporte, a detalle atomista, de la interacción péptido-membrana en el fenómeno de unión de las β -neurotoxinas de alacrán con los canales Nav's. Pese a las diferentes interacciones mostradas por las toxinas nCsslI y rCsslI-RCR, nuestras simulaciones exhibieron a ambas toxinas formar los mismos enlaces iónicos con el sDSV-II del hNav1.6. Estas interacciones fueron generadas por los aminoácidos LYS8, LYS13 y LYS18 de ambos péptidos con los residuos ASP836, GLU782 y GLU838 del sDSV-II respectivamente (Ver figuras 24A.a la 24D). Pudiendo esta similitud en interacciones iónicas con el sDSV-II poder ser una explicación del fenómeno β -neurotóxico generado por estas proteínas.

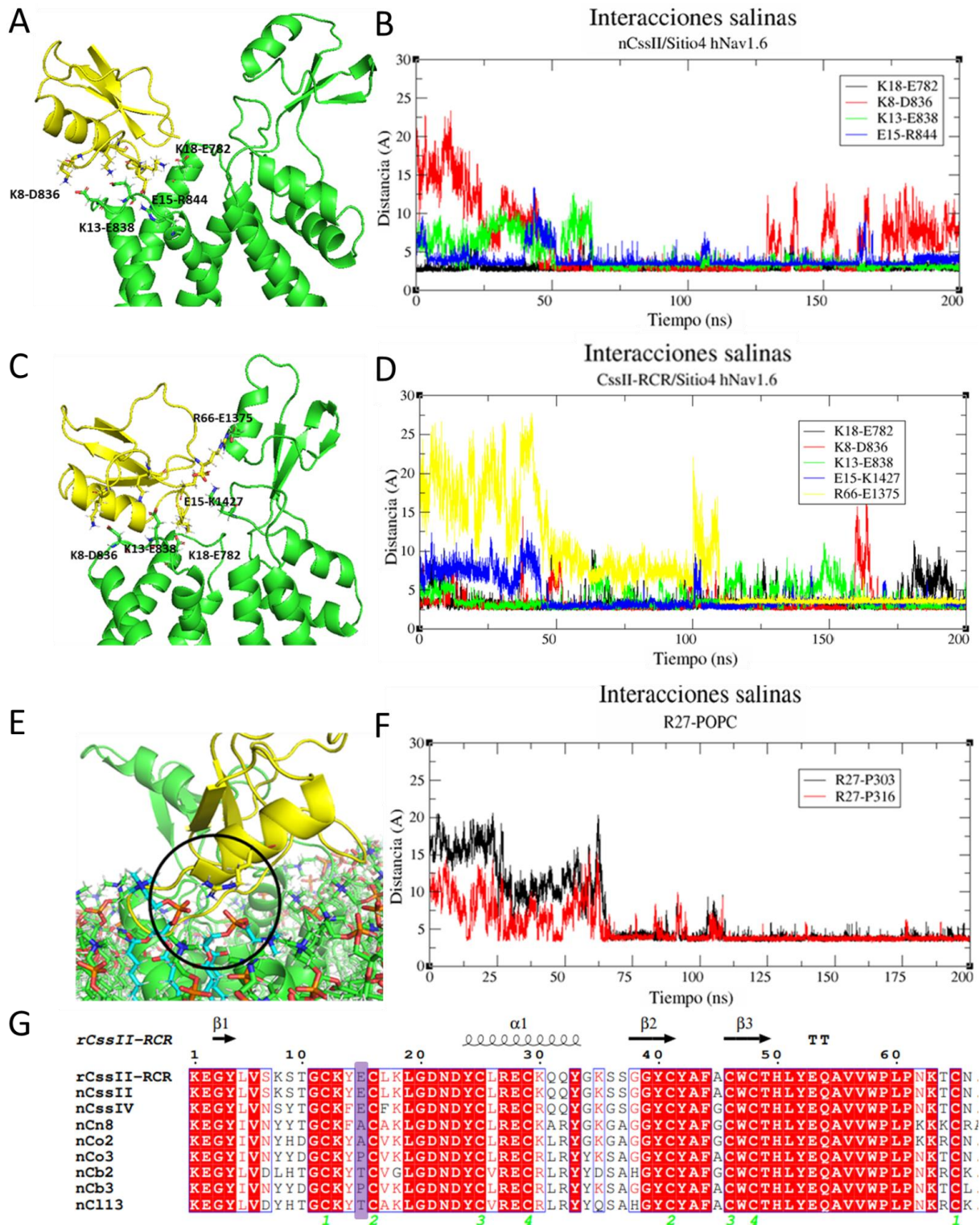
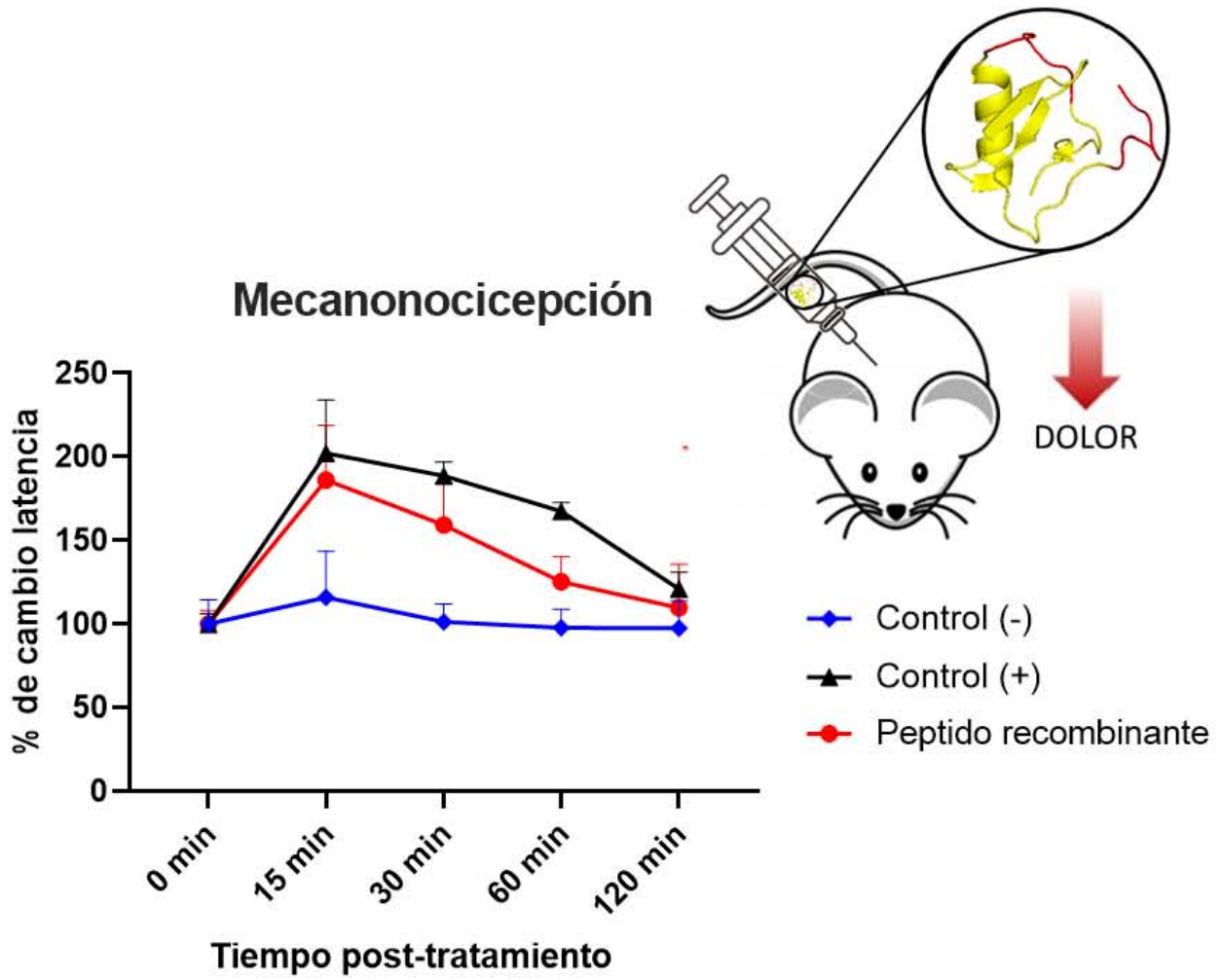


Figura 24. Interacciones salinas por parte de las β -neurotoxinas nCssII y rCssII-RCR sobre el sitio 4 del canal hNav1.6. Puentes salinos por parte de la toxina nCssII con el sitio 4 del canal hNav1.6 (A y B). Puentes salinos por parte de la toxina rCssII-RCR con el sitio 4 del canal hNav1.6 (C y D). Interacciones iónicas por parte de la β -neurotoxina nCssII con los grupos fosfato de la membrana (E y F). Interacción iónica por parte de ARG27 con los grupos fosfatos de la membrana encerrada en círculo de color negro. Alineamiento de secuencia de β -neurotoxinas de alacrán del género *Centruroides* (G). Localización del residuo encargado de atrapar el sensor de voltaje sombreado de morado en el alineamiento.

8.1.8 Atrapamiento del sensor de voltaje

Las β -neurotoxinas de alacrán tienen la capacidad de mover los umbrales de activación a valores más negativos mediante un mecanismo conocido como atrapamiento del sensor de voltaje (aS4) [5]. Esta teoría sugiere que la toxina actúa, mediante la unión de un residuo ácido (GLU15), con el sensor de voltaje (S4). Generando esto una conformación en el segmento S4 que facilita la pronta activación del canal. Este residuo, GLU15, está conservado en algunas secuencias de β -neurotoxinas del género *Centruroides* como es el caso de la toxina CsslV (Ver figura 3). Observando que la mutación de este residuo, para la toxina CsslV, provoca la pérdida de la actividad de mover los umbrales de activación a valores más negativos en el canal Nav1.2 [46]. Sin embargo, actualmente se conocen otras β -neurotoxinas del género *Centruroides* que producen este efecto sin presentar el residuo GLU15, siendo un ejemplo de esto el caso del péptido Cn8 (Ver figura 24 G) [6,46]. Esta toxina exhibe un clásico efecto β -neurotóxico sobre los canales Nav1.1, Nav1.2 y Nav1.6, presentando la notable característica de tener al residuo ALA en lugar del GLU15. Por otro lado, Karbat y colaboradores en el 2010 reportaron a la mutante CsslV-GLU15/ALA con la habilidad de aS4 del canal Nav1.2, siendo esto último bajo particulares metodologías electrofisiológicas [64]. Estos reportes plantean la idea que el residuo GLU15 no es del todo necesario para el correcto funcionamiento de algunas β -neurotoxinas, pudiendo existir otro mecanismo por el cual estos péptidos mantienen al S4 en un estado despolarizado. Mientras que el reacoplamiento de la toxina nCsslII exhibió una unión de acorde a lo esperado, exhibiendo al residuo GLU15 en la formación de un enlace iónico con la primera CA el residuo ARG844, la variante rCsslII-RCR no presentó dicho mecanismo. Sin embargo, debido a la similitud de las regiones de contacto (N-terminal) mostradas por ambas toxinas, particularmente en la formación de interacciones iónicas con el asa conectora S3-S4 del sDSV-II, hipotetizamos que el aS4 está determina por esta región (Ver figuras 23 y 24). Pudiendo los enlaces LYS8-ASP836 y LYS13-GLU838 (toxina/receptor), generados por el N-terminal de ambas toxinas sobre los residuos ácidos del asa conectora S3-S4 previa al S4, evitar la repolarización del segmento S4. Permitiendo esto último mantener al sensor de voltaje en un conformación despolarizada, facilitando esto la apertura del canal a través de la reducción de la energía de activación en uno de sus cuatro dominios.

RESULTADOS EXPERIMENTALES



8.2 Resultados experimentales

8.2.1 Purificación de Cell8 del veneno del alacrán *Centruroides elegans*

Para obtener la toxina control Cell8 se purificó en total 4.8 mg del veneno de *C. elegans*, seleccionando el pico cuyo peso molecular es el más cercano a Cell8 (7451.49 Da). Este pico presenta un peso molecular de 7460 Da nombrándola como Cell8+8Da, siendo probable, un posible cambio en algún residuo perteneciente a la toxina Cell8, el responsable de este incremento en la masa (Ver figura 25A). Este pico presenta dos masas, 7460.22 y 6986.34 Da, las cuales no fue posible su separación por rHPLC. Debido a esto, se utilizó cromatografía de intercambio catiónico para purificar a Cell8+8Da (Ver figura 25B) para su posterior repurificación por rHPLC.

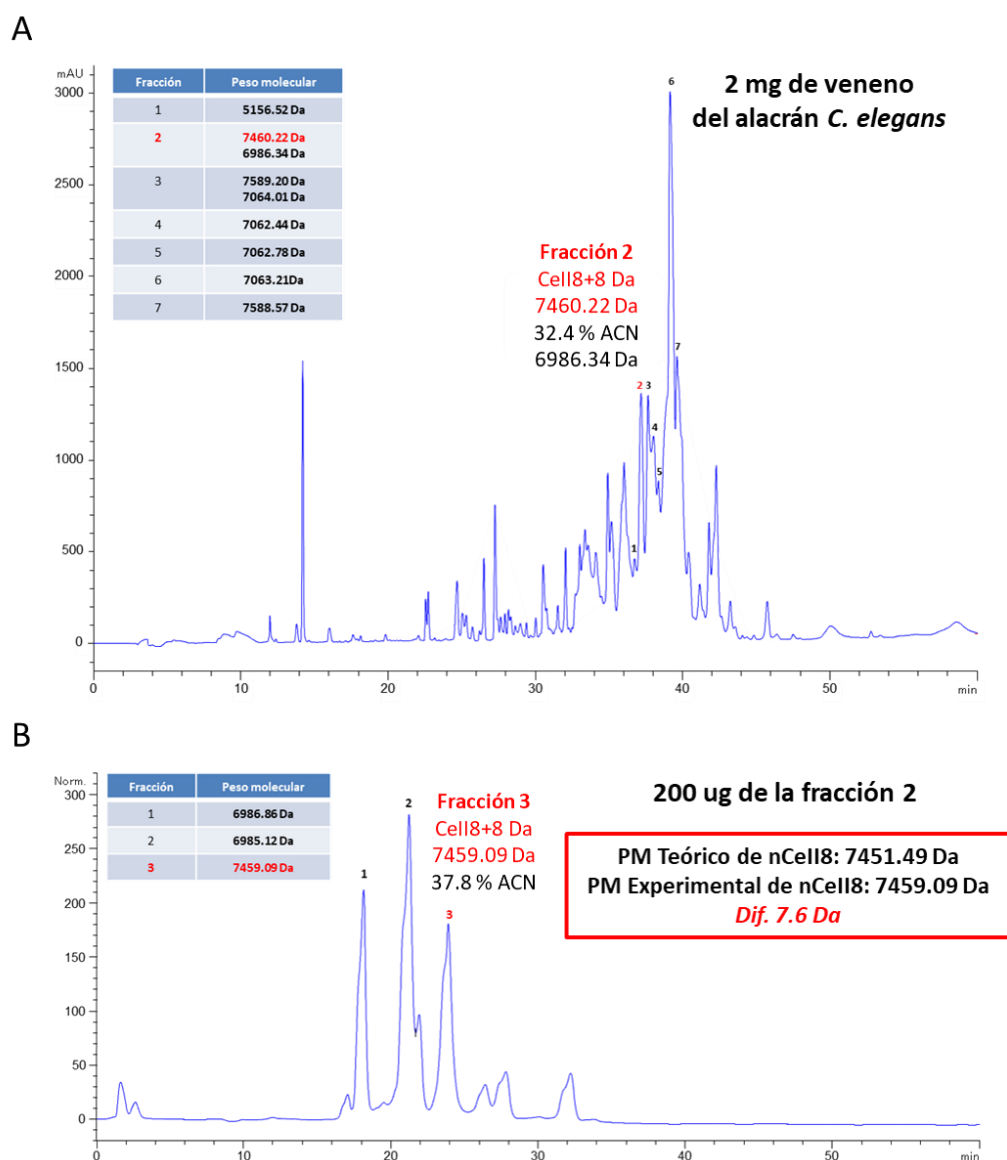


Figura 25. Cromatograma de purificación del veneno de *C. elegans*. Cromatograma de 2 mg de veneno completo de *C. elegans* por rHPLC, utilizando un gradiente de acetonitrilo de 0 a 60 % con 0.1% TFA durante 60 min (A). Cromatograma con 200 ug de la fracción 2 de rHPLC realizada por intercambio catiónico utilizando un gradiente de acetonitrilo de NaCl de 0 % a 100% en 50 min (B).

El rendimiento del primer paso de purificación para el péptido Cell8+8Da fue de aproximadamente 400 µg por 5 mg de veneno completo, siendo la cantidad total de proteína posterior al segundo paso de purificación de 44 µg. Bajo el supuesto que Cell8+8Da es una posible variante de la toxina de interés, se utilizó el coeficiente de extinción molar de Cell8 (Cof. Ext. Molar: 3.2) para evaluar el efecto de este péptido sobre el canal hNav1.7.

8.2.2 Purificación de Cell8 del veneno de fracciones de intercambio iónico

En el estudio de Vandersdreser en el 2010 se purificó el veneno de *C. elegans* mediante 3 metodologías consecutivas: 1) Exclusión molecular, 2) intercambio iónico y 3) rHPLC. Durante este segundo paso de purificación se generaron 12 fracciones, siendo la número 8 aquella donde se localizó la toxina Cell8 (Ver figura 26A). A pesar de que esta elusión fue agotada en el trabajo anteriormente mencionado, se purificaron fracciones flanqueantes, donadas por el Dr. Possani, con el fin de encontrar remanentes del péptido de interés. Únicamente la fracción 7 presentó un peso molecular correspondiente a la toxina Cell8, obteniendo un total de 3.43 ug (Cof. Ext. Molar: 3.2) por 50 mg de elusión (Ver figura 26B).

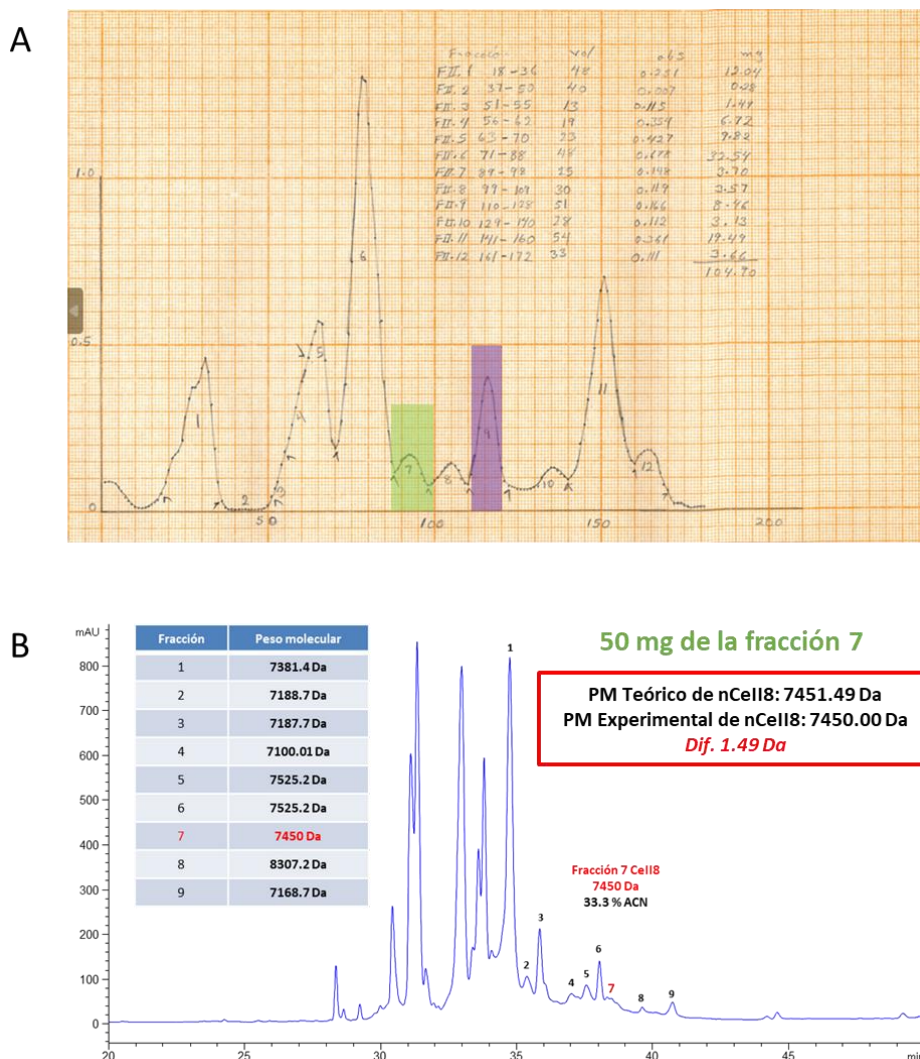


Figura 26. Cromatogramas de repurificación del veneno de *C. elegans*. Cromatograma del veneno completo de *C. elegans* por intercambio iónico (A). Cromatograma de 50 mg de la fracción 7 por rHPLC, utilizando un gradiente de acetonitrilo de 0 a 60 % con 0.1% TFA durante 60 min (B).

8.2.3 Ensayos de electrofisiología de la toxina Cell8 purificada del veneno de *C. elegans*

Se utilizó una concentración final de 1 μM , tres veces más a la utilizada por Vandersdreser y colaboradores en el 2010 [4], para evaluar el efecto de las presuntas toxinas purificadas sobre la isoforma del canal hNav1.7. Sin embargo, tanto la toxina Cell8 como el péptido Cell8+8 Da, no presentaron ningún efecto tipo β -neurotóxico (Ver figura 27A y 27B). Debido a que la fracción 7 se agotó durante el proceso de purificación de la toxina Cell8, así como la incertidumbre sobre la autenticidad del péptido Cell8+8Da, se optó por continuar el proyecto utilizando únicamente la secuencia del péptido Cell8 y la información computacional disponible.

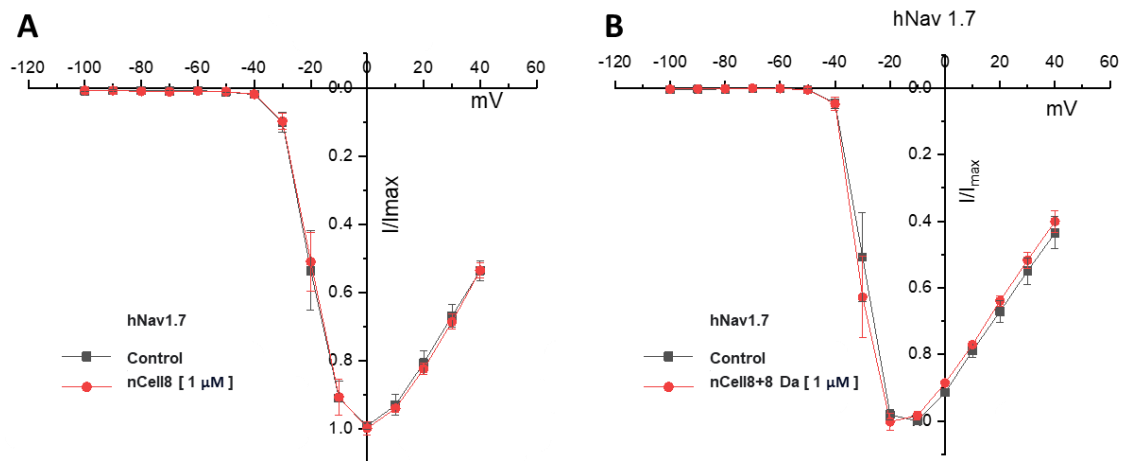


Figura 27. Efecto de toxinas sobre curvas de corriente-voltaje (I/V) de la isoforma del canal hNav1.7. Toxina Cell8/hNav1.7 (A). Toxina Cell8+8Da/hNav1.7 (B). Todas las toxinas fueron probadas a una concentración final de 1 μM . Los puntos corresponden al promedio de las mediciones (n=4) y las barras al error estándar de la media.

8.2.4 Diseño de variantes peptídicas de rCsslI-RCR

Se utilizó el modo de unión de las β -neurotoxinas nCsslI y RCsslI-RCR, generadas en este trabajo, para aproximar regiones en la secuencia primaria de la toxina Cell8 que podrían estar involucradas en el reconocimiento del canal (Ver figura 28). Esto último con el objetivo de generar variantes de HisrCsslI-RCR con la habilidad de modular el hNav1.7. Para ello se seleccionó las regiones localizadas en el N y C-terminal de la toxina Cell8, mimetizando primeramente las propiedades eléctricas del C-terminal, y posteriormente la doble carga negativa y la delección-mutación localizadas en el N-terminal (Ver regiones sombreadas de amarillo en la figura 28C). Esperando con ello que la variante HisrCsslI-TCD pierda actividad sobre el hNav1.6, y pueda generar un reconocimiento por el hNav1.7, y sobre este péptido, agregar algún motivo correspondiente al N-terminal que mejore la interacción con el canal objetivo. Ya que los aminoácidos en posiciones 10 y 11 se encuentran entre regiones de interacción importantes con el hNav1.6 (Ver figuras 23C y 23D), se espera que las variantes HisrCsslI-EE-RCR y HisrCsslI-EE-TCD puedan generar o potenciar un efecto en el hNav1.7. Por otro lado, se espera que la disminución del área de contacto, vía delección-mutación de la región L19-D21/D23A, permita mejorar la interacción por parte de las variantes HisrCsslI-Del-D23A-RCR y HisrCsslI-Del-D23A-TCD con el sDSV-II, permitiendo generar un efecto tipo β sobre el hNav's de interés.

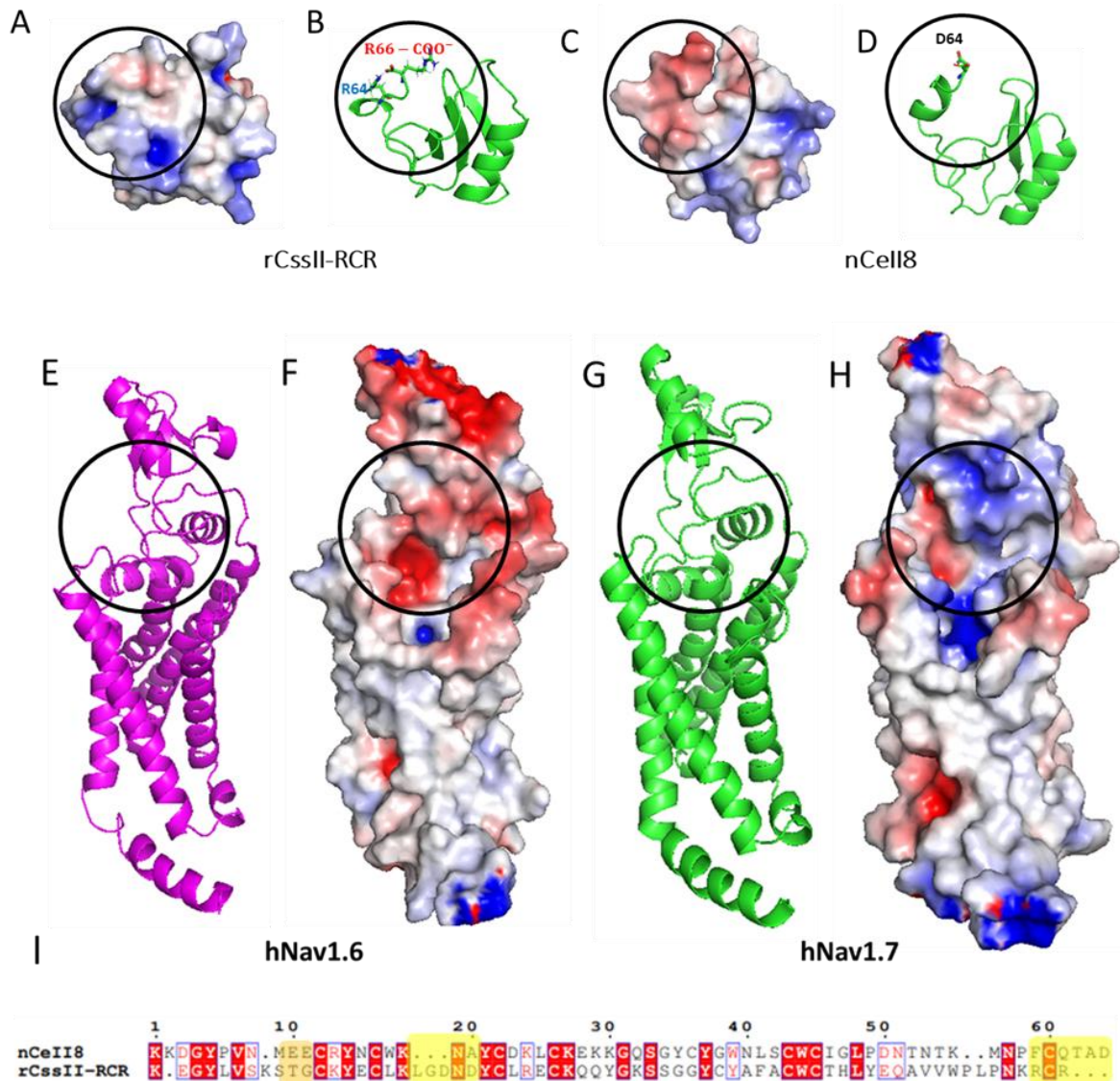


Figura 28. Mapas de potencial electrostático y estructura tridimensional de β -neurotoxinas y sitio 4 de los hNav1.6 y hNav1.7. Toxina rCsslI-RCR (A y B). Toxina Cell8 (C y D). Sitio 4 del canal hNav1.6 (E y F). Sitio 4 del canal hNav1.7 (G y H). Alineamiento de secuencia de β -toxinas de alacrán del género *Centruroides* (I).

8.2.5 Producción de variantes peptídicas del péptido HisrCsslI-RCR

Todas las variantes peptídicas fueron correctamente producidas a través de la mutación del plásmido pQE30 con el inserto rCsslI-RCR. Todas las secuencias fueron corroboradas mediante su respectiva secuenciación de ADN. Posterior a su transformación y expresión, mediante el uso de la cepa *E. coli Shuffle*, cada variante fue purificada de cuerpos de inclusión, observando que esta fracción fue la única con la presencia de una banda correspondiente al peso molecular de las variantes de interés (Ver figura 29). Este fenómeno, acorde con el reporte de Estrada y colaboradores, en el cual, todas las variantes de rCsslI fueron obtenidas en la fracción insoluble. El proceso de purificación por níquel-NTA, de los cuerpos de inclusión, fue analizado a través de geles de acrilamida al 15 %, siendo todas las eluciones con 400 mM de imidazol colectadas y reducidas con DTT para su posterior purificación por rHPLC(Ver figura 29).

Seguidamente se realizaron plegamientos *in vitro* para cada variante reducida, observando que todas las masas moleculares calculadas, para cada fracción purificada, coincidió con el estado correcto estado de un péptido reducido y oxidado. Esto último exhibiendo, en todos los casos, un error menor a 2 dáltones (límite máximo permitido por el equipo) (Ver tabla 7).

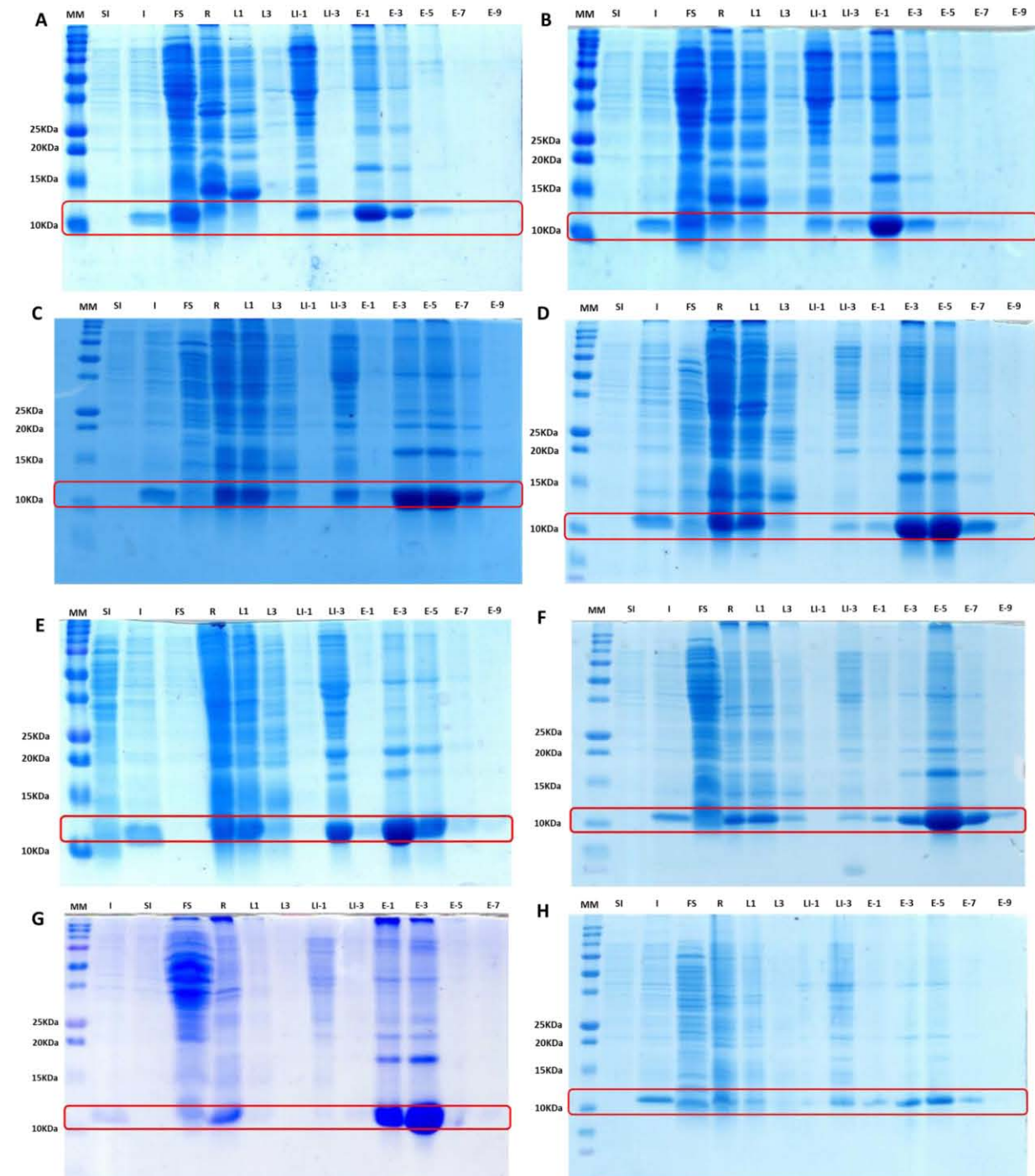


Figura 29. Geles de acrilamida al 15% para la purificación de las variantes. HisrCsslI-RCR (A), HisrCsslI-TCD (B), HisrCsslI-TCR (C) y HisrCsslI-S7R-Del-D23A-TCD (D). HisrCsslI-Del-D23A-RCR (E), HisrCsslI-Del-D23A-TCD (F), HisrCsslI-EE-RCR (G) y HisrCsslI-EE-TCD (H). MM: marcador de peso molecular, SI: Células sin inducir, I: Células inducidas, FS: fracción soluble, R: Recirculado, LX: Lavado con Tris-HCl, LI-X: Lavado con 40 mM de Imidazol, E-X: Eluciones con 400 mM de Imidazol. Péptidos purificados con el peso molecular de interés marcados con cuadro rojo.

Tabla 7. Pesos moleculares para variantes peptídicas de HisrCsslI-RCR

Variante peptídica	PM Experimental péptido reducido (Da)	Dif PM (Da)	PM Experimental péptido oxidado (Da)	Dif. PM (Da)
HisrCsslI-RCR	9497.01	0.77	9489.88	0.1
HisrCsslI-TCR	9442.82	0.12	9434.70	0.08
HisrCsslI-TCD	9402.42	0.82	9394.68	1.08
HisrCsslI-Del-D23A-RCR	9169.04	0.57	9161.05	0.35
HisrCsslI-S7R-Del-D23A-TCD	9140.55	0.85	9132.68	0.72
HisrCsslI-Del-A-TCD	9072.72	0.43	9064.91	0.62
HisrCsslI_EE_RCR	9597.86	0.42	9589.86	0.06
HisrCsslI_EE_TCD	9502.65	0.98	9494.47	0.8

*PM: Peso molecular
*Dif: Diferencia entre peso molecular teórico - experimental

Todas las fracciones cromatográficas de purificación, para cada variante, se localizaron en porcentajes de elusión de acetonitrilo (ACN) que correspondieron a una proteína oxidada (31-35%) y reducida (39-43%). Estos porcentajes de elusión fueron correctamente correlacionados con los reportes existentes para las variantes de rCsslI [10,11]. Se observó que todas las variantes generadas en este trabajo presentaron un patrón de plegamiento similar, siendo la variante HisrCsslI-RCR la única que exhibió una única fracción predominante (Ver figuras 30 y 31). Esto último fue semejante al patrón cromatográfico observado para las toxinas nCsslI y HisrCsslI, las cuales presentaron el mismo plegamiento en sus estructuras (Ver discusión de la sección 8.1.1). Ya que los péptidos nCsslI, HisrCsslI y HisrCsslI-RCR exhiben actividad letal, aunado a esto el hecho de que todas estas proteínas muestran un único pico cromatográfico, conjeturamos que las fracciones mayoritarias pueden corresponder al estado nativo de cada péptido.

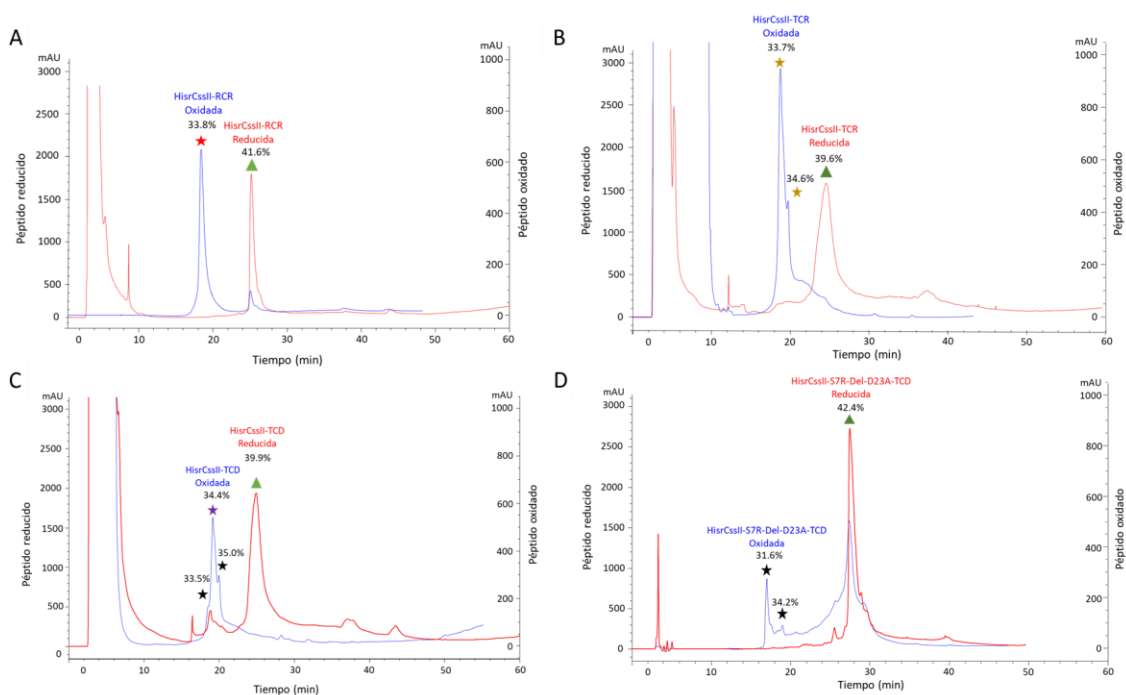


Figura 30. Cromatogramas de reducción y plegamiento de variantes peptídicas I. Variantes HisrCsslI-RCR (A), HisrCsslI-TCD (B), HisrCsslI-TCR (C) y HisrCsslI-S7R-Del-D23A-TCD (D). Péptidos plegados y reducidos de color azul y rojo respectivamente. Estrellas indican inyección de 300 ng de péptido vía intracraneal. Estrellas rojas indicativo de letalidad, oro indicativo de toxicidad, azules indicativo de posible efecto antinociceptivo y negras indicativo de un efecto nulo.

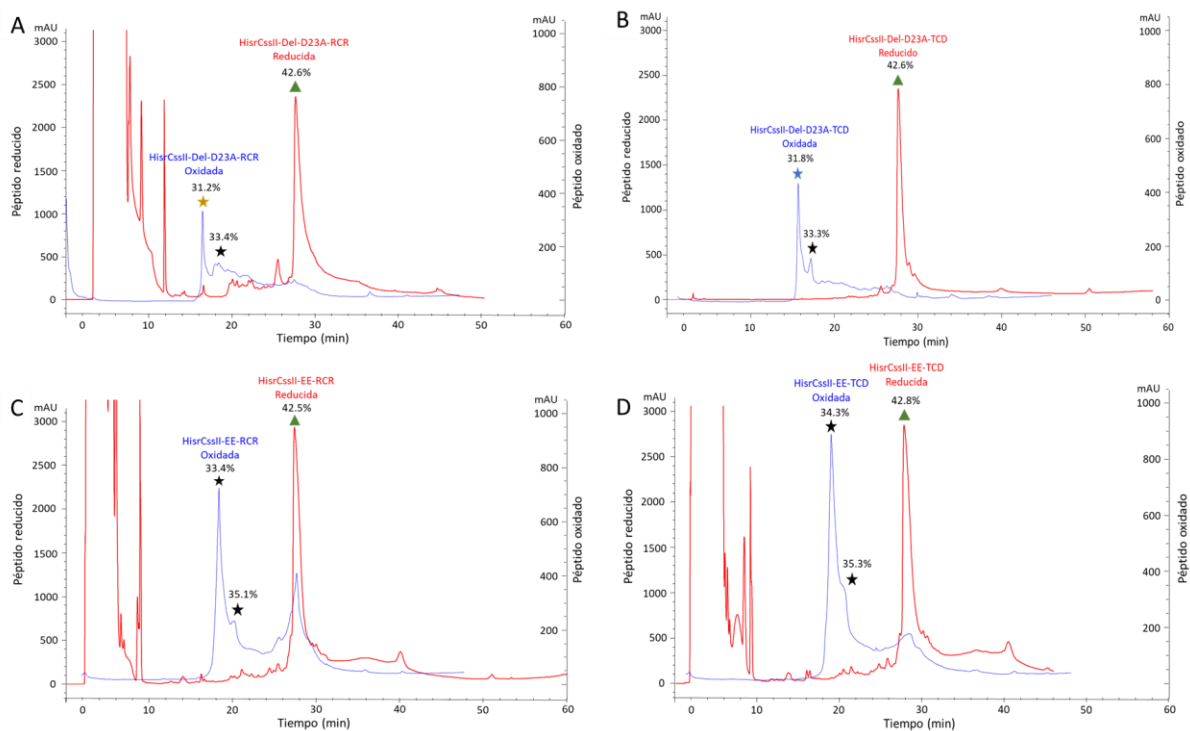


Figura 31. Cromatogramas de reducción y plegamiento de variantes peptídicas II. Variantes HisrCsslI-Del-D23A-RCR (A), HisrCsslI-Del-D23A-TCD (B), HisrCsslI-EE-RCR (C) y HisrCsslI-EE-TCD (D). Péptidos plegados y reducidos de color azul y rojo respectivamente. Estrellas indican inyección de 300 ng de péptido vía intracraneal. Estrellas rojas indicativo de letalidad, oro indicativo de toxicidad, azules indicativo de posible efecto antinociceptivo y negras de un efecto nulo.

Esto último respaldado en el hecho que solo las fracciones predominantes, en la mayoría de los casos, presentaron efectos destacables, pudiendo correlacionar la actividad de cada péptido con su correcto plegamiento. Este fenómeno observado (plegamiento/actividad) en las variantes de HisrCsslI-RCR pueden correlacionarse con la “hipótesis termodinámica” postulada por Anfinsen [67]. Conjeturando que las fracciones minoritarias corresponden a otros estados conformacionales diferentes al mínimo energético (fracción mayoritaria).

8.2.6 Prueba de toxicidad de variantes peptídicas de rCsslI-RCR en modelo murino

En la mayoría de las pruebas sólo las fracciones predominantes, pertenecientes a las variantes de HisrCsslI-RCR, produjeron efectos notables en el comportamiento de los ratones (Ver tabla 8). Únicamente el péptido control HisrCsslI-RCR fue letal, siendo los péptidos HisrCsslI-Del-D23A-RCR y HisrCsslI-TCR las únicas variantes que presentaron signos de intoxicación como lo es la parálisis, espasmos, giros involuntarios y dificultad respiratoria. Esta falta de actividad letal se correlaciona apropiadamente con nuestro modelo de interacción propuesto en este trabajo, observando que modificar la electrostática del C-terminal y eliminar una región importante para la interacción del N-terminal podría estar influyendo en el correcto acoplamiento del péptido sobre el canal hNav1.6. Siendo la región del N terminal como lo es L19 en HisrCsslI-Del-D23A-RCR importante para la interacción con el sDSV-II y R64 en HisrCsslI-TCR para neutralizar la carga del C-terminal de la toxina orientada al sDFP-III.

Ya que la variante HisrCsslI-TCR solo fue un intermediario, debido a la metodología utilizada, para obtener al péptido con motivo TCD no se construyeron otras variantes peptídicas con terminación en secuencia TCR. Por otro lado, se observó que ninguna de las variantes con motivo EE en el N-terminal exhibió efectos diferentes al control negativo inyectado con PBS. Estas variantes, HisrCsslI-EE-RCR y HisrCsslI-EE-TCD, fueron construidas debido a que la presencia de la doble carga en el N-terminal de la toxina Cell8 es inusual en comparación con la secuencia de las β -NTxEC, siendo interesante conocer su relevancia biológica. Esto aunado a que nuestro mapa de contactos de la rCsslI-RCR (Ver figura 23) exhibe a esta doble carga entre dos zonas de interacción, esperando que la mimetización de este motivo pudiera mejorar la orientación de estos u otros residuos para su interacción. Sin embargo, la pérdida del efecto tóxico puede ser explicado por la disposición espacial de la región mutada, observando que esta región se localizó en un asa conectora orientada hacia la membrana plasmática. Debido a esto se hipotetiza que estos residuos con carga negativa podrían estar repeliéndose con los grupos fosfatos de la membrana plasmática evitando su correcta unión con el sSDV-II traduciéndose en el efecto nulo posterior a su administración en ratones. Los ratones administrados con las variantes HisrCsslI-TCD y HisrCsslI-Del-D23A-TCD no presentaron síntomas de intoxicación en comparación con los péptidos con motivo RCR o TCR. Sin embargo, estos individuos exhibieron un comportamiento diferente al del control negativo (PBS), observando insensibilidad a estímulos mecánicos durante los primeros 30 y 45 minutos respectivamente post administración. Este fenómeno de letargo, observado en los ratones, fue asociado con un posible efecto antinociceptivo producido, a través de la modulación de los Nav's relacionados a la nocicepción, por parte de los péptidos HisrCsslI-TCD y HisrCsslI-Del-D23A-TCD. Se demostró que los péptidos con motivo TCD, a excepción de la variante HisrCsslI-EE-TCD, evitaron la toxicidad produciendo un efecto interesante a nivel comportamiento animal. Este motivo reafirma la teoría que la carga electrostática del C-terminal es importante para la actividad tóxica de los péptidos, así como plantea la hipótesis que su inversión de carga podría mejorar el reconocimiento por receptores. Observando que la variante HisrCsslI-Del-D23A-TCD también produjo insensibilidad, pero su efecto fue más prolongado al combinarlo con la delección/mutación planteada en la figura 28 I. Este cambio, al estar localizado en la primer asa conectora, podría estar mejorando el número o el tipo de contactos con el sSDV-II, permitiendo afectar la dinámica de apertura del canal y con ello alterar la señalización del SNP el SNC. Debido a los prometedores efectos causados por las variantes HisrCsslI-TCD y HisrCsslI-Del-D23A-TCD, se decidió implementar un ensayo de mecanocicepción para conocer y, de ser el caso, estimar de manera cuantitativa la posible potencia antinociceptiva presentada por estos péptidos

Tabla 8. Efecto de variantes peptídicas de HisrCsslI-RCR en modelo murino

Variante peptídica	Efecto en administración intracraneal 300 ng (4DL50)
HisrCsslI-RCR	LETAL
HisrCsslI-TCR	TOXICA NO LETAL
HisrCsslI-TCD	POSIBLE ACTIVIDAD ANTINOCICEPTIVA
HisrCsslI-Del-D23A-RCR	TOXICA NO LETAL
HisrCsslI-S7R-Del-D23A-TCD	SIN ACTIVIDAD
HisrCsslI-Del-A-TCD	POSIBLE ACTIVIDAD ANTINOCICEPTIVA
HisrCsslI_EE_RCR	SIN ACTIVIDAD
HisrCsslI_EE_TCD	SIN ACTIVIDAD

8.2.7 Ensayos de electrofisiología para variantes de rCsslI-RCR

Debido a las limitaciones metodológicas presentadas por la técnica de Patch-clamp únicamente se realizaron registros electrofisiológicos sobre las variantes que produjeron insensibilidad mecánica sobre ratones. Estos ensayos fueron realizados para evaluar si los cambios realizados sobre la variante HisrCsslI-RCR generaron un reconocimiento, y con ello, y modificar la dinámica del canal objetivo el hNav1.7. La variante control HisrCsslI-RCR exhibió los dos efectos clásicos pertenecientes a las β -NTxEC, observando la reducción del pico de la corriente máxima (RdPCMx) y la apertura del canal a umbrales más negativos (AdCUMN) del hNav1.6 [11], siendo el efecto sobre el hNav1.7 nulo (Figura 32A y 32B). Se observó que la variante rCsslI-TCD no presentó ningún efecto sobre el hNav1.6, así como en el canal objetivo hNav1.7 (Figura 32C y 32D). Este resultado nos permitió establecer que modificar la carga electrostática del C-terminal, no es suficiente para promover un cambio de selectividad por parte del péptido HisrCsslI-RCR hacia el hNav1.7. Abriendo la posibilidad de que el requerimiento de interacciones, para la formación de un complejo con el sitio 4 del canal hNAV1.7, sea mayor a las que puede generar el péptido *perse*. Por otro lado, la nula actividad sobre el canal hNav1.6 se correlacionó apropiadamente con la hipótesis electrostática del C-terminal propuesta en este trabajo. Observando que el uso de una concentración un orden de magnitud superior ($5 \mu\text{M}$) a la reportada por estrada y colaboradores ($0.5 \mu\text{M}$), no fue suficiente para generar un efecto tipo β sobre esta isoforma.

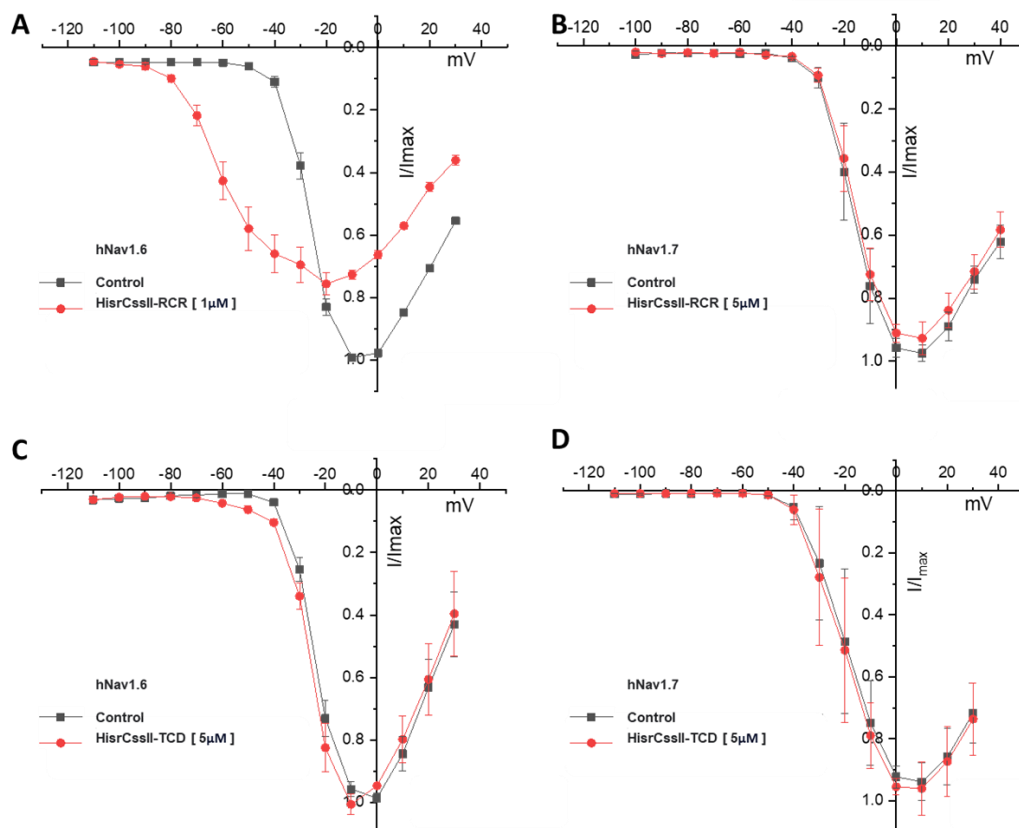


Figura 32. Efecto de las variantes peptídicas de HisrCsslI-RCR sobre las isoformas del hNav1.6 y hNav1.7-I. Efecto de péptido HisrCsslI-RCR sobre la isoforma del hNav1.6 (A) y hNav1.7 (B). Efecto de péptido HisrCsslI-TCD sobre la isoforma del hNav1.6 (C) y hNav1.7 (D). Los puntos corresponden al promedio de las mediciones (n=4) y las barras al error estándar de la media.

Las variantes con el motivo Del-D23A mostraron los clásicos efectos tipo- β sobre ambos canales, evidenciando el importante papel del N-terminal en el reconocimiento de los Nav's (Figura 5E-5H). A pesar de este logro, ambos péptidos produjeron resultados distintos dependiendo del motivo expresado en el C-terminal. Mientras que la HisrCsslI-Del-D23A-RCR presentó RdPCMx y la AdCUMN sobre el canal hNav1.6, el efecto exhibido sobre el hNav1.7 fue únicamente la RdPCMx (Ver figura 33A y 33B). Estas actividades sobre ambos canales exponen la importancia de los residuos de la región Del-D23A en el reconocimiento del hNav1.7, así como la disminución de la AdCUMN sobre el hNav1.6 (Ver figura 32A y 33A). El hecho de que la variante HisrCsslI-Del-D23A-RCR resultara no letal respecto al péptido control HisrCsslI-RCR, sugiere una correlación entre la sección Del-D23A y la actividad de AdCUMN, la cual promueve la toxicidad del péptido (Ver tabla 8). Bajo el supuesto que la variante HisrCsslI-Del-D23A-RCR interactúa de manera similar al péptido HisrCsslI-RCR, la región correspondiente al cambio Del-D23A estaría orientado hacia al asa conectora S3-S4 del sDSV-II en el hNav1.6. Esto último nos permite proponer que la variante HisrCsslI-Del-D23A-RCR presenta un deficiente aS4 del sDSV-II, pudiendo explicar esto los efectos electrofisiológicos mostrados en las figura 32A y 33A. Así mismo hipotetizamos que este inadecuado acoplamiento podría mejorar la interacción por parte del péptido HisrCsslI-Del-D23A-RCR con otras regiones del sitio 4 en el canal hNav1.7, permitiendo con ello explicar la actividad de RdPCMx observado en nuestros ensayos de electrofisiología. Sin embargo aun se requieren determinar el modelo de interacción de la variante HisrCsslI-Del-D23A-RCR con el sitio 4 de los canales hNav1.6 y hNav1.7 para corroborar esta conjetura.

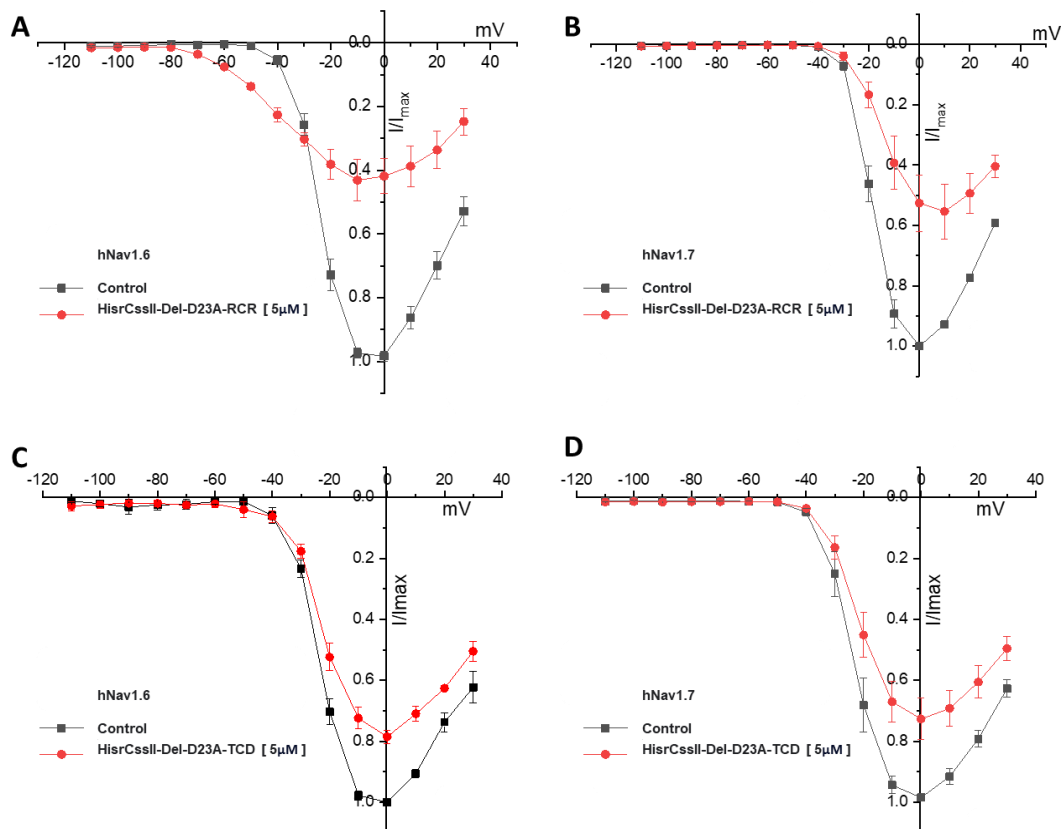


Figura 33 . Efecto de las variantes peptídicas de HisrCsslI-RCR sobre las isoformas del hNav1.6 y hNav1.7-II. Efecto de péptido HisrCsslI-Del-D23A-RCR sobre la isoforma del hNav1.6 (A) y hNav1.7 (B). Efecto de péptido HisrCsslI-Del-D23A-TCD sobre la isoforma del hNav1.6 (C) y hNav1.7 (D). Los puntos corresponden al promedio de las mediciones (n=4) y las barras al error estándar de la media.

De manera contrastante, la variante HisrCssl-Del-D23A-TCD presento únicamente RdPCMx sobre los canales hNav1.6 y hNav1.7 respecto al nulo efecto del péptido HisrCssl-TCD (Ver figuras 32C, 32D, 33C y 33D). A pesar de que este trabajo nos permite identificar y asociar regiones toxina/canal con su actividad, como es el caso de la hipótesis de la repulsión electrostática de rCssl (Ver sección 8.1.5), aún se requiere analizar el efecto de estas variantes en la afinidad de los complejos péptido/receptor. Debido a esto, es posible que el motivo Del-D23A no solamente remueva (parcial o totalmente) la actividad de AdCuMn, sino que permita mejorar la afinidad del péptido al interactuar con otras regiones del sitio 4. Logrando con ello asistir a la variante HisrCssl-Del-D23A-TCD en la unión con el hNav1.6 y evitando al mismo tiempo los efectos tóxicos del péptido. El efecto de RdPCMx generado por parte de la variante HisrCssl-Del-D23A-TCD es similar al mecanismo de algunos fármacos con actividad analgésica (bloqueo total o parcial de la corriente iónica). Debido a esto, se decidió evaluar la probable actividad antinociceptiva de esta variante a través de ensayos de mecanocicepción, permitiendo con ello conocer el potencial analgésico de este péptido recombinante [19,20,22].

8.2.8 Ensayos de mecanocicepción para las variantes de rCssl-RCR

Los ensayos de mecanocicepción, realizados para las variantes con motivo TCD, exhibieron efectos diferentes para cada uno de los péptidos (Ver figura 34). Por un lado, la variante HisrCssl-TCD no presentó efecto antinociceptivo significativo con respecto al vehículo control, siendo imposible evaluar a este péptido a una concentración mayor debido a que esta variante generó un efecto tóxico en el modelo murino. A pesar de que este péptido no presenta actividad sobre el hNav1.6, no se descarta la posibilidad que la variante HisrCssl-TCD pueda estar interactuando con otras isoformas de los hNav's. Las β -NTxEC exhiben de manera natural promiscuidad por diversas isoformas de los hNav's, pudiendo este fenómeno estar presente en la variante HisrCssl-TCD. Esta promiscuidad podría explicar el efecto tóxico observado en los ratones, así como la dosis dependencia por parte de esta variante. Esto último, a través de la formación de interacciones deficientes por parte de HisrCssl-TCD con los diferentes receptores localizados en el sitio de administración.

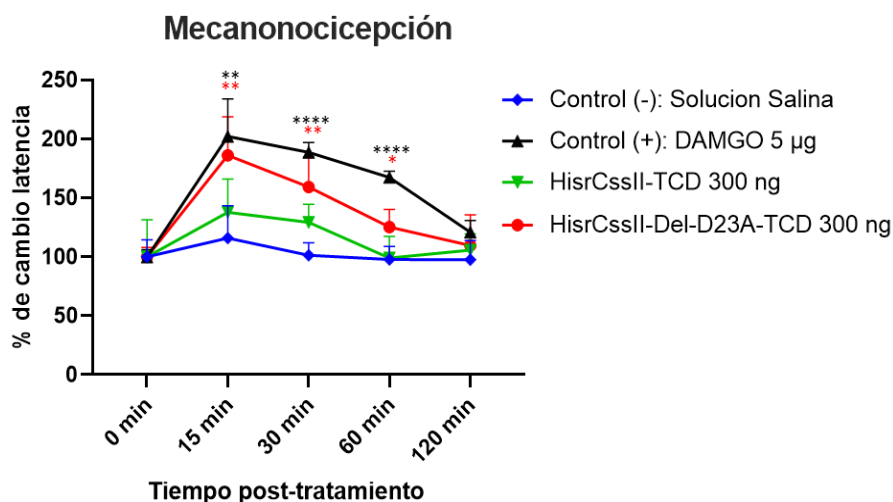


Figura 34. Pruebas de mecanocicepción de variantes peptídicas de rCssl-RCR. Ensayos de mecanocicepción de variantes peptídicas rCssl-TCD y rCssl-RCR en ratones CD1 (20gr) (C). Los datos se presentan como media \pm D.E. de cada grupo (n = 5-7). *P < 0,05; **P < 0,01; ****P < 0,0001, el código de color de los asteriscos representa las diferencias del mismo grupo de color frente al control negativo. DAMGO: péptido sintético opioide.

Por otro lado, el péptido HisrCsslI-Del-D23A-TCD sí exhibió actividad antinociceptiva durante la primera hora postratamiento respecto al vehículo control (solución salina). La actividad antinociceptiva mostrada por parte de esta variante se correlaciona apropiadamente con los efectos electrofisiológicos exhibidos, observando a este péptido exhibir un mecanismo similar al de otras moléculas con actividad analgésica. Siendo este mecanismo generado a través de la reducción total o parcial de la corriente iónica de los canales de sodio dependientes de voltaje, como es el caso de la lidocaína [19,20,22]. La vía de administración de los péptidos probados fue intratecal, específicamente entre el espacio intervertebral L5-L6, permitiendo esto evaluar el efecto de los péptidos en la señalización de la red de los ganglios dorsales (RGD). Esta región, localizada en el sistema nervioso periférico (SNP), transmite y codifica la información de estímulos nocivos a través de potenciales de acción generados por canales de iónicos [68]. Siendo el papel de los Nav's exhibidos en este tejido (Nav1.1-Nav1.9) crítico para la iniciación y propagación de estos potenciales [69]. A pesar de que la RGD presenta varias isoformas de los Nav's, estos muestran diferentes patrones de expresión según el tipo de neurona, siendo la expresión de los Nav1.7-Nav1.9 dada mayoritariamente en neuronas nociceptivas [70–72]. Por otro lado, aunque el papel del Nav1.6 en la nocicepción no está del todo claro, existen algunos estudios que reportan a este canal como importante en patologías relacionadas al dolor crónico-inflamatorio [73,74]. Debido a esta información hipotetizamos que el péptido HisrCsslI-Del-D23A-TCD podría estar interrumpiendo la transmisión de estímulos dolorosos del SNP al SNC, vía reducción de la corriente del Nav1.6 y Nav1.7, generando el efecto antinociceptivo mostrado en los ensayos de mecanocicepción. A pesar del favorable efecto exhibido por la variante HisrCsslI-Del-D23A-TCD, aún se requiere complementar este estudio probando la actividad de este péptido sobre el resto de isoformas de los Nav's. Esto último con el fin de conocer la posible habilidad de este péptido modular otros canales relacionados a la nocicepción, como pueden ser los Nav1.3 y Nav1.8 y 1.9, así como otras isoformas que puedan desarrollar efectos diferentes a los inicialmente deseados. Por otra parte, el péptido HisrCsslI-Del-D23A-TCD exhibió un efecto analgésico equiparable al control positivo DAMGO durante los primeros 30 min postratamiento (Ver figura 11). El péptido sintético DAMGO es un análogo de la morfina que presenta unión al receptor μ -opioides, siendo este uno de varios receptores opioides relacionados en la transmisión de los estímulos dolorosos en el sistema nervioso [75]. A pesar de los benéficos efectos analgésicos producidos por las moléculas de unión al receptor μ -opioides, la gran mayoría de estas sustancias presentan la problemática de generar efectos adversos, como lo es la tolerancia y adicción en el caso de la morfina o el fentanilo [75–77]. Una alternativa a esta problemática es la modulación de otro tipo de receptores, como es el caso del fármaco Ziconotide. Este péptido sintético, inspirado en la Ω -conotoxina del caracol *Conus magus*, es utilizado como un potente analgésico conocido comercialmente como Prialt. Este péptido, cuya administración es intratecal, tiene la capacidad de bloquear corrientes de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, reduciendo la liberación de neurotransmisores e inhibiendo, de esta manera, la transmisión del impulso doloroso [78,79]. Al ser originalmente una toxina que afecta Nav's, y basado en nuestro diseño racional del blanco molecular a modular, creemos que el péptido HisrCsslI-Del-D23A-TCD podría no presentar los efectos adversos generados por los moduladores de los receptores μ -opioides. Pudiendo este péptido, cuyo mecanismo de acción y administración es similar a Ω -conotoxina, ser una alternativa al desarrollo de drogas analgésicas sin efectos adversos a las moléculas opioides. Sin embargo, aún se requieren realizar estudios de tolerancia y comportamiento para el péptido HisrCsslI-Del-D23A-TCD para afianzar esta conjetura.

8.2.9 Potencial y alcances de la variante HisrCsslI-Del-D23A-TCD: Modelos de Dolor Inflamatorio y Neuropático.

Debido al potente efecto antinociceptivo mostrado por el péptido HisrCsslI-Del-D23A-TCD, se decidió evaluar el efecto de esta variante sobre dos modelos de dolor como lo son el inflamatorio y el neuropático. La principal diferencia entre ambos modelos radica en el origen de la patología del dolor, siendo el primero causado por una respuesta inflamatoria y el segundo generado por daño o disfunción de los nervios [80]. Se pudo apreciar que la variante HisrCsslI-Del-D23A-TCD presentó efecto antinociceptivo en ambos modelos, observando un mejor efecto en el modelo de dolor inflamatorio respecto al neuropático (Ver Figura 35). Se observó que el péptido HisrCsslI-Del-D23A-TCD exhibió un efecto antinociceptivo durante todo el ensayo en el modelo inflamatorio, mostrando una potencia similar al del control positivo de analgesia DAMGO durante los primeros 30 min postratamiento. Esta potencia, exhibida durante los primeros 30 min, permitió la recuperación del estado de hipersensibilidad al dolor (hiperalgesia) de los sujetos de estudio a su estado basal sin inducción. Por otro lado, la variante HisrCsslI-Del-D23A-TCD también generó un efecto antinociceptivo en el modelo neuropático, siendo el efecto mostrado por el péptido recombinante fue similar al del control positivo de analgesia Gabapentina (GB). A pesar del efecto generado por ambas sustancias, HisrCsslI-Del-D23A-TCD y GB, estas fueron incapaces de recuperar al modelo murino del estado de hiperalgesico. Observando un aumento en porcentaje de cambio de latencia durante la primera hora, pero sin llegar al estado basal antes de la inducción por lesión nerviosa. Aunque la relación entre la cantidad y el tipo de receptores involucrados en el proceso de nocicepción es compleja, únicamente se tomó en cuenta a los canales de Nav's para explicar los fenómenos anti nociceptivos observados en los modelos de dolor evaluados [7,80–82]. Esto último basado en el hecho de que la toxina utilizada como molde (HisrCsslI-RCR), para crear la variante HisrCsslI-Del-D23A-TCD, es afín al canal Nav1.6. Aunado a esto la promiscuidad de reducir el pico de corriente exhibida por esta variante, por el Nav1.6 y Nav1.7, como principal mecanismo de alteración de la nocicepción. Como se mencionó anteriormente la RGD, región donde se administró los tratamientos, exhibe todas las isoformas de las hNav's. Siendo las isoformas de los Nav1.3, Nav1.6, Nav1.7, Nav1.8 y Nav1.9 las principales implicadas en el fenómeno de la nocicepción. Por un lado, existen estudios que relacionan el aumento en la expresión de los canales Nav1.7 y Nav1.8 en modelos inflamatorios, siendo estos inducidos a través del uso de Adyuvante completo de Freud en ratas [83,84]. Así mismo, la modulación de estas corrientes (Nav1.7 y Nav1.8) así como el de otras isoformas como el de los canales Nav1.6 y Nav1.9 han sido relacionadas al control de la alodinia (Hiperalgesia) [73,74,85–89]. Debido a esto se conjetura que la variante HisrCsslI-Del-D23A-TCD podría estar mejorando en umbral nociceptivo en el modelo inflamatorio a través de la reducción del pico de corriente máxima de los canales Nav1.6 y Nav1.7. Sin embargo, debido a la promiscuidad que exhibe la variante HisrCsslI-Del-D23A-TCD por las isoformas anteriormente mencionados, no se descarta la idea que este péptido puede estar interactuando con otros Nav's relacionadas al dolor. Por otro lado, el efecto en la expresión y activación de los canales Nav1.3, Nav1.7 y Nav1.8 en la RGD ha sido descrito como importante para el desarrollo y preservación del dolor neuropático [90–92]. Por este motivo se vinculó la actividad antinociceptiva mostrada en el modelo murino con la interacción del péptido HisrCsslI-Del-D23A-TCD, con el Nav1.7. No obstante, la relación del dolor neuropático con otros canales, como lo son los Nav1.3 y Nav1.8, es compleja, pudiendo los posibles cambios compensatorios de estas otras isoformas alterar el efecto analgésico del péptido. Siendo la posible falta de modulación de estas otras isoformas una explicación de la baja potencia antinociceptiva observada en el modelo neuropático.

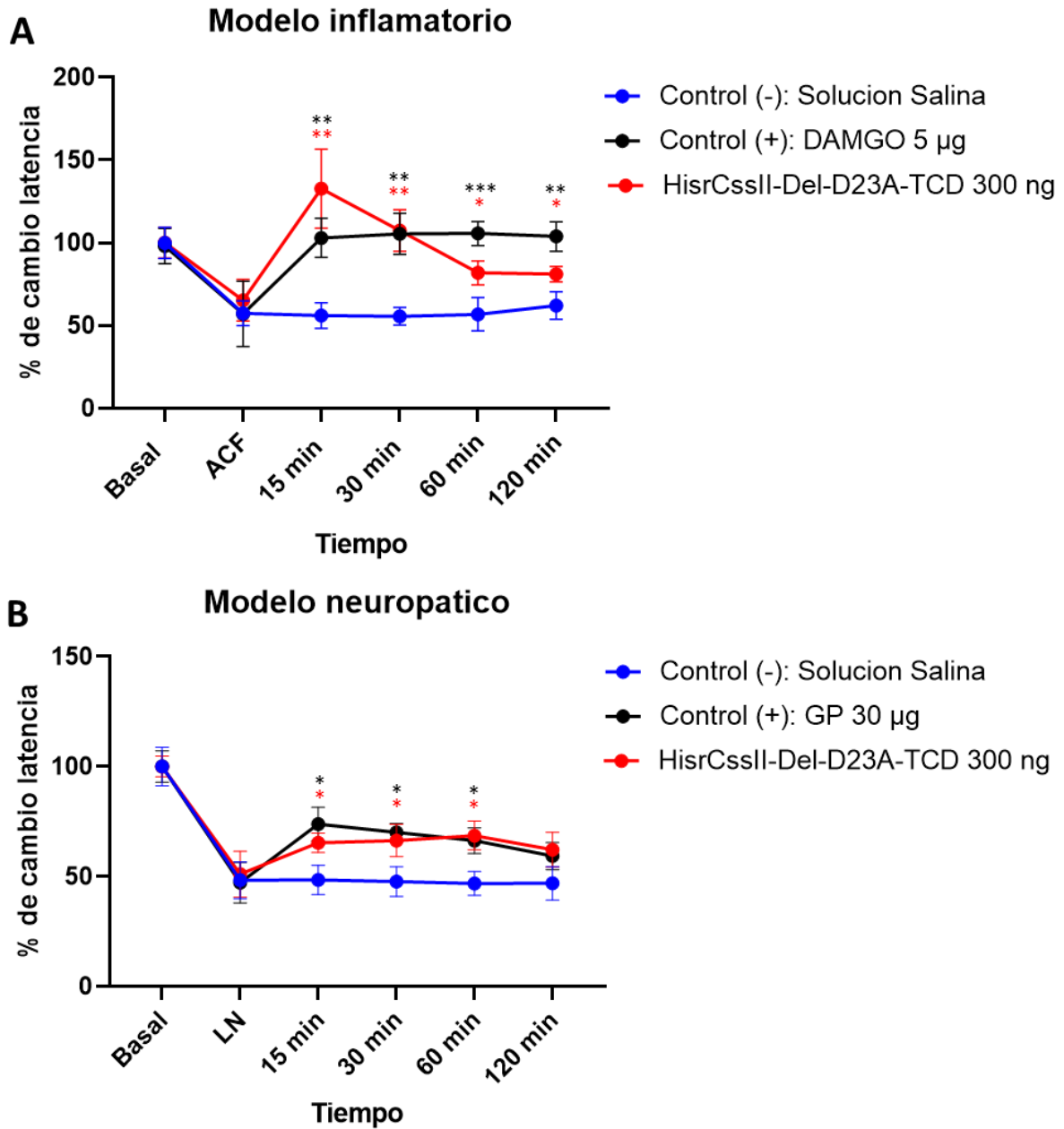
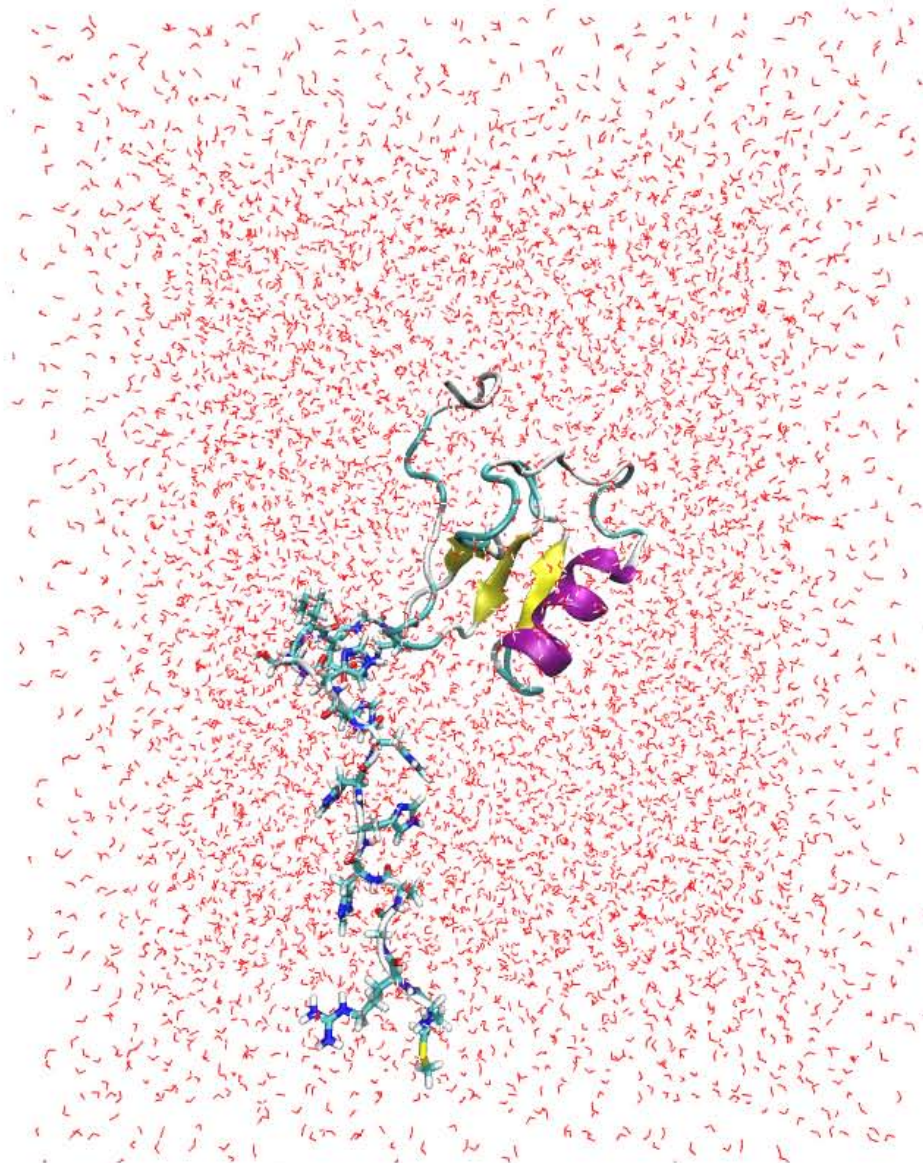


Figura 35. Pruebas de mecanoccepción para la variante peptídica rCsslI-Del-D23A-TCD. Ensayos de mecanoccepción en modelo inflamatorio (A). Ensayo de mecanoccepción en modelo neuropático (B). Pruebas realizadas en ratones CD1 (20 gr). Los datos se presentan como media \pm D.E. de cada grupo (n = 6). *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001, el código de color de los asteriscos representa las diferencias del mismo grupo de color frente al control negativo. ACF: Adyuvante completo de Freud. Lesión nerviosa. DAMGO: péptido sintético opioide. GP: Gabapentina.

A pesar de que ambos modelos exhiben al péptido HisrCsslI-Del-D23A-TCD como una molécula con potencial analgésica, aún se requiere complementar este trabajo probando la actividad de esta variante sobre el resto de los Nav's. Esto último, con el fin de evaluar la posible habilidad moduladora de este péptido sobre otros canales relacionados a la nocicepción (Nav1.3, Nav1.6, Nav1.8 y 1.9), así como con otras isoformas que puedan desarrollar efectos diferentes a los diseñados inicialmente. Permitiendo con ello comprender los mecanismos antinociceptivos de este péptido para posibilitar el desarrollo de diferentes tratamientos en combinación con otras moléculas analgésicas. Del mismo modo, la comprensión de la dinámica de interacción de la variante HisrCsslI-Del-D23A-TCD con el resto de las isoformas de los Nav's, facilita la dilucidación de áreas importantes en la formación de complejos péptido/canal. Logrando con ello, desde un enfoque biológico-estructural, el desarrollo de nuevas variantes que mejoren los efectos anti nociceptivos mostrados en este trabajo. Así mismo, considerando que una extracción promedio de veneno de alacrán equivale a 1 mg por individuo [93], y considerando que la toxina Cell8 representa el 1.3 % del veneno total [12], el rendimiento del péptido HisrCsslI-Del-D23A-TCD corresponde a una ordeña aproximada de 320 alacrán es (Ver anexo IV). Siendo el diseño racional y la obtención heteróloga de este péptido una alternativa viable para la obtención de moléculas con potencial analgésico, sin depender de fuentes naturales.

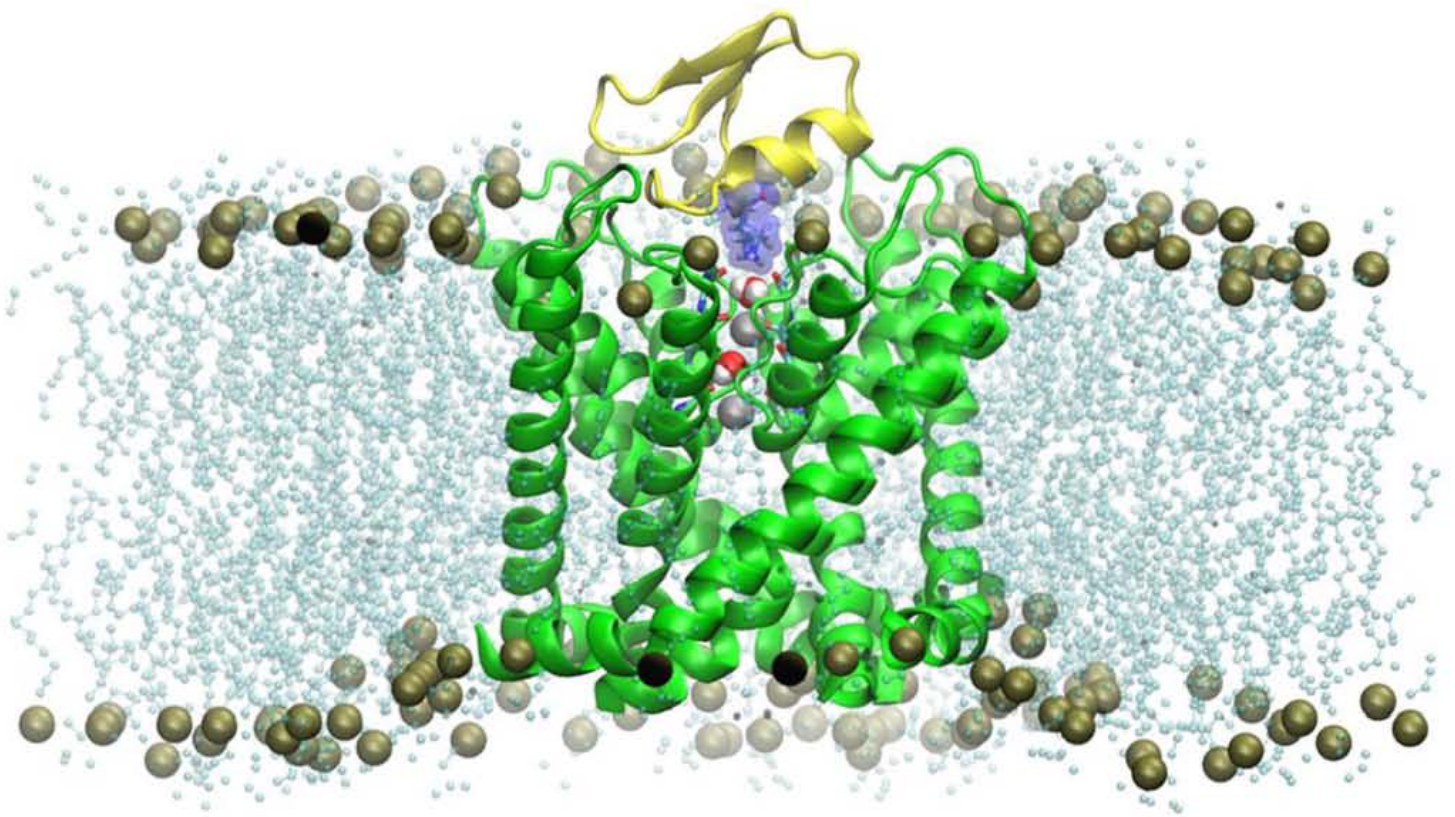
CONCLUSIONES



9 Conclusiones

En este trabajo se dilucido el importante papel de la electrostática del C-terminal para la unión de las β -neurotoxinas del género *Centruroides* nCsslI, rCsslI y rCsslI-RCR con el sitio 4 de los Nav's. Por otro lado, se obtuvo un modelo de interacción que exhibe regiones importantes por parte de las β -neurotoxinas nCsslI y CsslI-RCR en interacción con el sitio 4 del hNav1.6. En ambas toxinas se observó a la región del C-terminal y al asa conectora β 2- β 3 en interacción con el subdominio formador del poro III, así mismo se exhibió al N-terminal de cada péptido interactuando con el dominio sensor de voltaje, particularmente con el asa conectora S3-S4. Ambas toxinas presentaron similitud en su forma de unión con el sitio 4 del hNav1.6, permitiendo estos modelos hipotetizar mecanismos moleculares por el cual se lleva el de atrapamiento del sensor de voltaje (aS4). Estos modelos revelaron que el aS4 no necesariamente está dado por la interacción directa de la toxina con el segmento sensor de voltaje (S4) como es el caso de nCsslI. Siendo la interacción del N-terminal de la toxina, con el asa conectara S3-S4 previa al S4 del canal clave para mantener al S4 en un estado despolarizado que produzca el efecto tipo β característico de estas toxinas tal como el péptido rCsslI-RCR. Estos modelos aquí generados permitieron inferir regiones importantes, a nivel secuencia primaria, de la toxina Cell8 para generar variantes de la rCsslI-RCR con actividad sobre el hNav1.7. Únicamente las variantes con motivo Del-D23A exhibieron la habilidad de modular al canal objetivo, observando diferencias significativas, a nivel comportamiento en el modelo murino, según el motivo expresado en el C-terminal. La modificación de la región N-terminal del péptido HisrCsslI-RCR, mediante la obtención de la variante HisrCsslI-Del-A-RCR, generó un péptido tóxico en ratones con los clásicos efectos tipo β sobre el canal hNav1.6. Sin embargo, esta variante únicamente presentó la habilidad de reducir el pico de la corriente máxima, sin modificar la voltaje dependencia de activación del canal hNav1.7. Por otra parte, la variante con modificación en el N y C-terminal, denominada HisrCsslI-Del-D23A-TCD, presentó la habilidad de reducir el pico de la corriente máxima de los canales hNav1.6 y el hNav1.7 sin presentar signos de toxicidad en ratones. Este péptido exhibió potencial antinociceptivo, mediante ensayos de mecanocicepción, siendo esta actividad equiparable al de un control positivo de analgesia (DAMGO) durante los primeros 30 min postratamiento. Por otro lado, esta variante presentó un efecto analgésico en modelos de dolor inflamatorio y neuropático, observado una recuperación total del estado de hiperalgesia durante los primeros 30 min posterior a la administración del péptido en el modelo inflamatorio. Sin embargo, HisrCsslI-Del-D23A-TCD no presentó recuperación total en el modelo de dolor neuropático, observando una potencia media durante la primera hora posterior al tratamiento con el péptido. Este trabajo resalta la importancia de utilizar diferentes disciplinas emergentes, como la biología estructural computacional para el diseño racional de moléculas con potencial terapéutico. Destacando como resultado, de vincular esta disciplina con técnicas *in vitro* e *in vivo*, un péptido recombinante con propiedades analgésicas, siendo la variante HisrCsslI-Del-D23A-TCD un ejemplo de ello.

PROSPECTIVAS



10 Prospectivas.

- Realizar la caracterización electrofisiológica del resto de variantes de rCsslI-RCR sobre todas las isoformas de los canales Nav's.
- Evaluar el efecto electrofisiológico de la variante rCsslI-Del-D23A-TCD en isoformas de los canales Nav's relacionadas a la nocicepción.
- Generar el modelo de interacción de la toxina Cell8 con el hNav1.7.
- Generar el modelo de interacción de la variante rCsslI-Del-D23A-TCD con el hNav1.7.
- Optimizar la variante rCsslI-Del-D23A-TCD mediante el diagrama metodológico de la figura 36

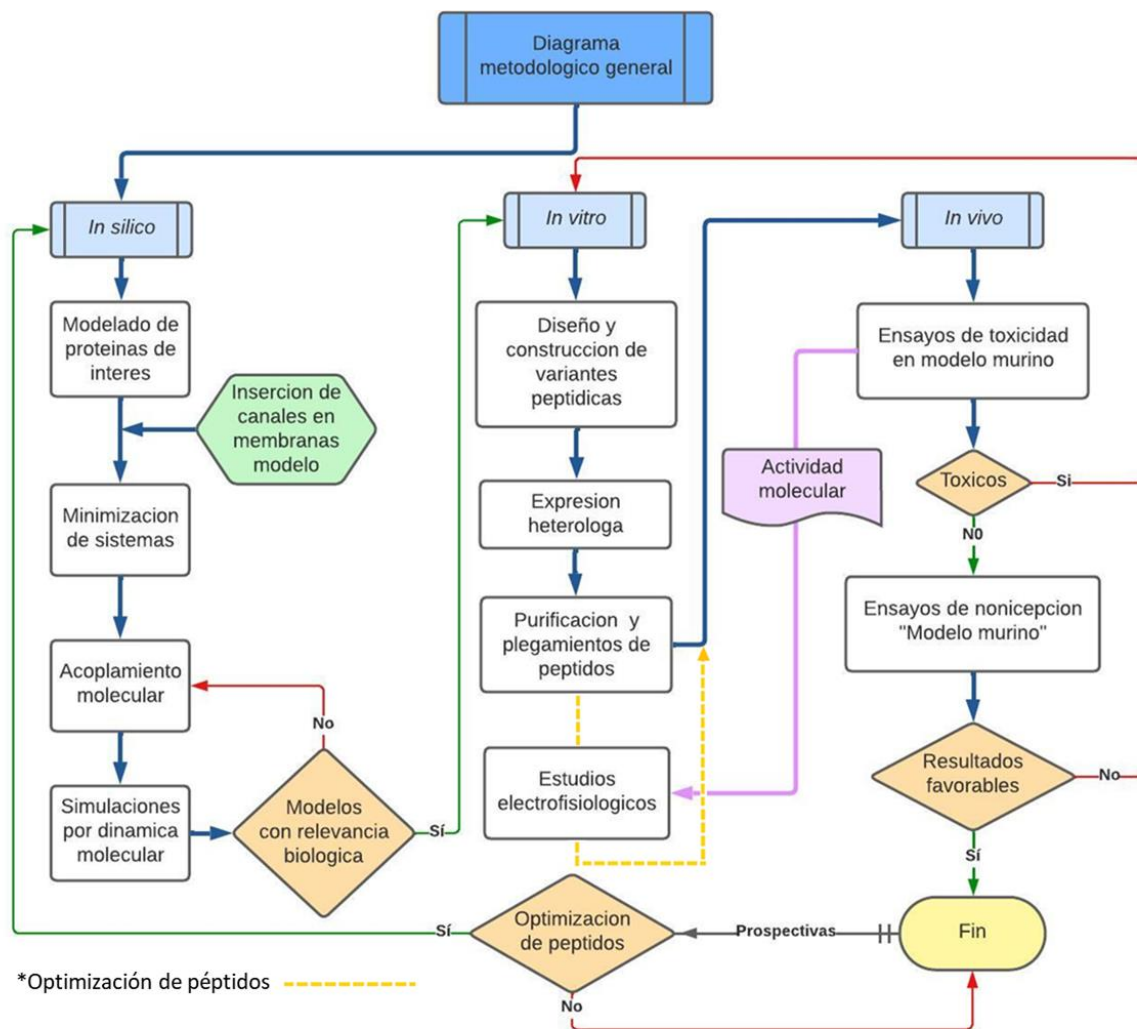
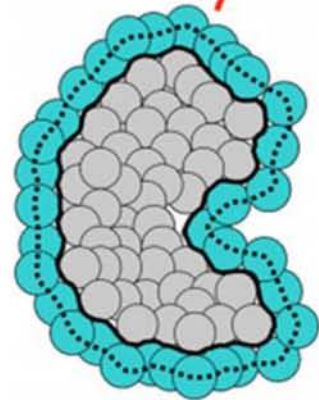
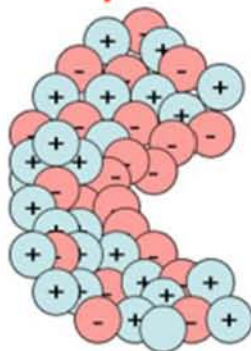
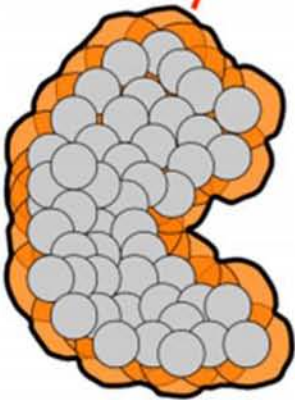


Figura 36. Diagrama metodológico propuesto para optimización de péptidos.

REFERENCIAS Y ANEXOS

$$-\nabla \cdot \epsilon(\mathbf{x}) \nabla \phi(\mathbf{x}) = \rho_f(\mathbf{x}) + \sum_m q_m c_m e^{-\beta[q_m \phi(\mathbf{x}) + V_m(\mathbf{x})]}$$



$$G[\phi] = \frac{1}{4\pi} \int_{\Omega} \left\{ \rho_f(\mathbf{x}) \phi(\mathbf{x}) - \frac{\epsilon(\mathbf{x})}{2} [\nabla \phi(\mathbf{x})]^2 + \sum_m c_m e^{-\beta V_m(\mathbf{x})} [e^{-\beta q_m \phi(\mathbf{x})} - 1] \right\} d\mathbf{x}$$

$$\mathbf{F}_i[\phi] = -\frac{\partial G[\phi]}{\partial \mathbf{r}_i} = -\frac{1}{4\pi} \int_{\Omega} \left\{ \frac{\partial \rho_f(\mathbf{x})}{\partial \mathbf{r}_i} \phi(\mathbf{x}) - \frac{1}{2} \frac{\partial \epsilon(\mathbf{x})}{\partial \mathbf{r}_i} [\nabla \phi(\mathbf{x})]^2 + \sum_m c_m \frac{\partial e^{-\beta V_m(\mathbf{x})}}{\partial \mathbf{r}_i} [e^{-\beta q_m \phi(\mathbf{x})} - 1] \right\} d\mathbf{x}$$

Reaction
field

Dielectric
boundary

"Osmotic"

11 Referencias.

1. Dworakowska B, Dołowy K. Ion channels-related diseases. *Acta Biochim Pol.* 2000;47: 685–703.
2. Chahine M. *Voltage-gated Sodium Channels: Structure, Function and Channelopathies.* Springer; 2018.
3. de la Vega RCR, Possani LD. Novel paradigms on scorpion toxins that affects the activating mechanism of sodium channels. *Toxicon.* 2007;49: 171–180.
4. Leipold E, Borges A, Heinemann SH. Scorpion β -toxin interference with NaV channel voltage sensor gives rise to excitatory and depressant modes. *J Gen Physiol.* 2012;139: 305–319.
5. Cestèle S, Qu Y, Rogers JC, Rochat H, Scheuer T, Catterall WA. Voltage sensor-trapping: enhanced activation of sodium channels by beta-scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II. *Neuron.* 1998;21: 919–931.
6. Schiavon E, Pedraza-Escalona M, Gurrola GB, Olamendi-Portugal T, Corzo G, Wanke E, et al. Negative-shift activation, current reduction and resurgent currents induced by β -toxins from *Centruroides* scorpions in sodium channels. *Toxicon.* 2012;59: 283–293.
7. Levinson SR, Luo S, Henry MA. The role of sodium channels in chronic pain. *Muscle Nerve.* 2012;46: 155–165.
8. Bennett DL, Clark AJ, Huang J, Waxman SG, Dib-Hajj SD. The Role of Voltage-Gated Sodium Channels in Pain Signaling. *Physiol Rev.* 2019;99: 1079–1151.
9. Espino-Solis GP, Estrada G, Olamendi-Portugal T, Villegas E, Zamudio F, Cestele S, et al. Isolation and molecular cloning of beta-neurotoxins from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*. *Toxicon.* 2011;57: 739–746.
10. Estrada G, Garcia BI, Schiavon E, Ortiz E, Cestele S, Wanke E, et al. Four disulfide-bridged scorpion beta neurotoxin CsslI: heterologous expression and proper folding in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1770: 1161–1168.
11. Estrada G, Restano-Cassulini R, Ortiz E, Possani LD, Corzo G. Addition of positive charges at the C-terminal peptide region of CsslI, a mammalian scorpion peptide toxin, improves its affinity for sodium channels Nav1.6. *Peptides.* 2011;32: 75–79.
12. Vandendriessche T, Olamendi-Portugal T, Zamudio FZ, Possani LD, Tytgat J. Isolation and characterization of two novel scorpion toxins: The alpha-toxin-like Cell8, specific for Na(v)1.7 channels and the classical anti-mammalian Cell9, specific for Na(v)1.4 channels. *Toxicon.* 2010;56: 613–623.
13. Pitt GS. *Ion Channels in Health and Disease.* Academic Press; 2016.
14. Wang J, Ou S-W, Wang Y-J. Distribution and function of voltage-gated sodium channels in the nervous system. *Channels.* 2017 [cited 10 May 2023]. doi:10.1080/19336950.2017.1380758
15. Andavan GSB, Lemmens-Gruber R. Voltage-gated sodium channels: mutations, channelopathies and targets. *Curr Med Chem.* 2011;18: 377–397.
16. Kruger LC, Isom LL. *Voltage-Gated Na⁺ Channels: Not Just for Conduction.* Cold

17. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets. *Drug Discov Today*. 2000;5: 506–520.
18. Kalso E. Sodium channel blockers in neuropathic pain. *Curr Pharm Des*. 2005;11: 3005–3011.
19. Alsaloum M, Higerd GP, Effraim PR, Waxman SG. Status of peripheral sodium channel blockers for non-addictive pain treatment. *Nat Rev Neurol*. 2020;16: 689–705.
20. Priest BT, Kaczorowski GJ. Blocking sodium channels to treat neuropathic pain. *Expert Opin Ther Targets*. 2007 [cited 10 May 2023]. doi:10.1517/14728222.11.3.291
21. Karnina R, Arif SK, Hatta M, Bukhari A. Molecular mechanisms of lidocaine. *Ann Med Surg (Lond)*. 2021;69: 102733.
22. Hermanns H, Hollmann MW, Stevens MF, Lirk P, Brandenburger T, Piegeler T, et al. Molecular mechanisms of action of systemic lidocaine in acute and chronic pain: a narrative review. *Br J Anaesth*. 2019;123: 335–349.
23. de Lera Ruiz M, Kraus RL. Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. *J Med Chem*. 2015;58: 7093–7118.
24. Kwong K, Carr MJ. Voltage-gated sodium channels. *Curr Opin Pharmacol*. 2015;22: 131–139.
25. Gamal El-Din TM, Scheuer T, Catterall WA. Tracking S4 movement by gating pore currents in the bacterial sodium channel NaChBac. *J Gen Physiol*. 2014;144: 147–157.
26. Jiang D, Shi H, Tonggu L, Gamal El-Din TM, Lenaeus MJ, Zhao Y, et al. Structure of the Cardiac Sodium Channel. *Cell*. 2020;180: 122–134.e10.
27. Bordon K de CF, Cologna CT, Fornari-Baldo EC, Pinheiro-Júnior EL, Cerni FA, Amorim FG, et al. From Animal Poisons and Venoms to Medicines: Achievements, Challenges and Perspectives in Drug Discovery. *Front Pharmacol*. 2020;11: 1132.
28. Possani LD, Becerril B, Delepierre M, Tytgat J. Scorpion toxins specific for Na⁺ channels. *Eur J Biochem*. 1999;264: 287–300.
29. Bosmans F, Tytgat J. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion alpha-toxins. *Toxicon*. 2007;49: 142–158.
30. Petricevich VL. Scorpion venom and the inflammatory response. *Mediators Inflamm*. 2010;2010: 903295.
31. Schaduangrat N, Lampa S, Simeon S, Gleeson MP, Spjuth O, Nantasenamat C. Towards reproducible computational drug discovery. *J Cheminform*. 2020;12: 9.
32. EMBL-EBI. Current Release Statistics. [cited 15 Nov 2023]. Available: https://www.ebi.ac.uk/uniprot/TrEMBLstats#:~:text=INTRODUCTION%20Release%202023_05%20of%2008,58327300%20entries%20have%20been%20revised.
33. Bank RPD. PDB Statistics: Overall Growth of Released Structures Per Year. [cited 15 Nov 2023]. Available: <https://www.rcsb.org/stats/growth/growth-released-structures>
34. Varadi M, Bertoni D, Magana P, Paramval U, Pidruchna I, Radhakrishnan M, et al.

- AlphaFold Protein Structure Database in 2024: providing structure coverage for over 214 million protein sequences. *Nucleic Acids Res.* 2023; gkad1011.
35. Sliwoski G, Kothiwale S, Meiler J, Lowe EW Jr. Computational methods in drug discovery. *Pharmacol Rev.* 2014;66: 334–395.
 36. Hameduh T, Haddad Y, Adam V, Heger Z. Homology modeling in the time of collective and artificial intelligence. *Comput Struct Biotechnol J.* 2020;18: 3494–3506.
 37. Xu Y, Xu D, Liang J. *Computational Methods for Protein Structure Prediction and Modeling: Volume 2: Structure Prediction.* Springer Science & Business Media; 2010.
 38. Dominguez C, Rolf Boelens A, Bonvin* AMJ. HADDOCK: A Protein–Protein Docking Approach Based on Biochemical or Biophysical Information. 2003 [cited 16 Nov 2023]. doi:10.1021/ja026939x
 39. Wiehe K, Peterson MW, Pierce B, Mintseris J, Weng Z. Protein-protein docking: overview and performance analysis. *Methods Mol Biol.* 2008;413: 283–314.
 40. Aminpour M, Montemagno C, Tuszynski JA. An Overview of Molecular Modeling for Drug Discovery with Specific Illustrative Examples of Applications. *Molecules.* 2019;24. doi:10.3390/molecules24091693
 41. Gervasio FL, Spiwok V, Mannhold R. *Biomolecular Simulations in Structure-Based Drug Discovery.* John Wiley & Sons; 2019.
 42. Ramakrishnan V, Patel K, Goyal R. *De Novo Peptide Design: Principles and Applications.* Academic Press; 2022.
 43. Hashemi ZS, Zarei M, Fath MK, Ganji M, Farahani MS, Afsharnouri F, et al. In silico Approaches for the Design and Optimization of Interfering Peptides Against Protein–Protein Interactions. *Front Mol Biosci.* 2021;8: 669431.
 44. Zhang JZ, Yarov-Yarovoy V, Scheuer T, Karbat I, Cohen L, Gordon D, et al. Structure-function map of the receptor site for β -scorpion toxins in domain II of voltage-gated sodium channels. *J Biol Chem.* 2011;286: 33641–33651.
 45. Zhang JZ, Yarov-Yarovoy V, Scheuer T, Karbat I, Cohen L, Gordon D, et al. Mapping the interaction site for a β -scorpion toxin in the pore module of domain III of voltage-gated Na(+) channels. *J Biol Chem.* 2012;287: 30719–30728.
 46. Cohen L, Karbat I, Gilles N, Ilan N, Benveniste M, Gordon D, et al. Common features in the functional surface of scorpion beta-toxins and elements that confer specificity for insect and mammalian voltage-gated sodium channels. *J Biol Chem.* 2005;280: 5045–5053.
 47. Chen R, Chung S-H. Conserved functional surface of antimammalian scorpion β -toxins. *J Phys Chem B.* 2012;116: 4796–4800.
 48. Shenkarev ZO, Shulepko MA, Peigneur S, Myshkin MY, Berkut AA, Vassilevski AA, et al. Recombinant Production and Structure-Function Study of the Ts1 Toxin from the Brazilian Scorpion *Tityus serrulatus*. *Dokl Biochem Biophys.* 2019;484: 9–12.
 49. Dai H, Yin S, Li T, Cao Z, Ji Y, Wu Y, et al. Recombinant expression, purification, and characterization of scorpion toxin Bm α TX14. *Protein Expr Purif.* 2012;82: 325–331.
 50. Turkov M, Rashi S, Noam Z, Gordon D, Ben Khalifa R, Stankiewicz M, et al. In vitro

- folding and functional analysis of an anti-insect selective scorpion depressant neurotoxin produced in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 1997;10: 123–131.
51. Saucedo AL, del Rio-Portilla F, Picco C, Estrada G, Prestipino G, Possani LD, et al. Solution structure of native and recombinant expressed toxin Cssl from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*, and their effects on Nav1.5 sodium channels. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1824: 478–487.
 52. Canul-Tec JC, Riaño-Umbarila L, Rudiño-Piñera E, Becerril B, Possani LD, Torres-Larios A. Structural basis of neutralization of the major toxic component from the scorpion *Centruroides noxius Hoffmann* by a human-derived single-chain antibody fragment. *J Biol Chem.* 2011;286: 20892–20900.
 53. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods.* 2015;12: 7–8.
 54. Webb B, Sali A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2016;54: 5.6.1–5.6.37.
 55. UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* 2021;49: D480–D489.
 56. Computational Lipidomics of the Neuronal Plasma Membrane. *Biophys J.* 2017;113: 2271–2280.
 57. Wu EL, Cheng X, Jo S, Rui H, Song KC, Dávila-Contreras EM, et al. CHARMM-GUI Membrane Builder toward realistic biological membrane simulations. *J Comput Chem.* 2014;35: 1997–2004.
 58. Montero-Dominguez PA, Corzo G. Characterization of the coupling mechanism of scorpion β -neurotoxins on the voltage-gated sodium channel hNav1.6. *J Biomol Struct Dyn.* 2023 [cited 16 Nov 2023]. doi:10.1080/07391102.2023.2181629
 59. Jurrus E, Engel D, Star K, Monson K, Brandi J, Felberg LE, et al. Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Sci.* 2018;27: 112–128.
 60. Liu H, Naismith JH. An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. *BMC Biotechnol.* 2008;8: 91.
 61. Rost B. Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein Eng.* 1999;12: 85–94.
 62. Pan X, Li Z, Zhou Q, Shen H, Wu K, Huang X, et al. Structure of the human voltage-gated sodium channel Na1.4 in complex with β 1. *Science.* 2018;362. doi:10.1126/science.aau2486
 63. Structural Basis of Nav1.7 Inhibition by a Gating-Modifier Spider Toxin. *Cell.* 2019;176: 702–715.e14.
 64. Karbat I, Ilan N, Zhang JZ, Cohen L, Kahn R, Benveniste M, et al. Partial agonist and antagonist activities of a mutant scorpion beta-toxin on sodium channels. *J Biol Chem.* 2010;285: 30531–30538.
 65. Henriques ST, Deplazes E, Lawrence N, Cheneval O, Chaousis S, Inserra M, et al. Interaction of Tarantula Venom Peptide ProTx-II with Lipid Membranes Is a Prerequisite for Its Inhibition of Human Voltage-gated Sodium Channel Nav1.7. *J Biol Chem.* 2016;291: 17049–17065.

66. Lawrence N, Wu B, Ligutti J, Cheneval O, Agwa AJ, Benfield AH, et al. Peptide-Membrane Interactions Affect the Inhibitory Potency and Selectivity of Spider Toxins ProTx-II and GpTx-1. *ACS Chem Biol*. 2018 [cited 20 Nov 2023]. doi:10.1021/acscchembio.8b00989
67. Anfinsen CB. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*. 1973;181: 223–230.
68. Berta T, Strong JA, Zhang J-M, Ji R-R. Targeting dorsal root ganglia and primary sensory neurons for the treatment of chronic pain: an update. *Expert Opin Ther Targets*. 2023;27: 665–678.
69. Sodium channels and the molecular pathophysiology of pain. 2000;129: 3–19.
70. Lee J-H, Park C-K, Chen G, Han Q, Xie R-G, Liu T, et al. A monoclonal antibody that targets a NaV1.7 channel voltage sensor for pain and itch relief. *Cell*. 2014;157: 1393–1404.
71. Bao L. Trafficking regulates the subcellular distribution of voltage-gated sodium channels in primary sensory neurons. *Mol Pain*. 2015;11: 61.
72. Chang W, Berta T, Kim YH, Lee S, Lee S-Y, Ji R-R. Expression and Role of Voltage-Gated Sodium Channels in Human Dorsal Root Ganglion Neurons with Special Focus on Nav1.7, Species Differences, and Regulation by Paclitaxel. *Neurosci Bull*. 2018;34: 4–12.
73. Xie W, Strong JA, Ye L, Mao J-X, Zhang J-M. Knockdown of sodium channel NaV1.6 blocks mechanical pain and abnormal bursting activity of afferent neurons in inflamed sensory ganglia. *Pain*. 2013;154: 1170–1180.
74. Xie W, Zhang J, Strong JA, Zhang J-M. Role of Na_v1.6 and Na_vβ4 Sodium Channel Subunits in a Rat Model of Low Back Pain Induced by Compression of the Dorsal Root Ganglia. *Neuroscience*. 2019;402: 51–65.
75. Dumitrascuta M, Bermudez M, Ballet S, Wolber G, Spetea M. Mechanistic Understanding of Peptide Analogues, DALDA, [Dmt]DALDA, and KGOP01, Binding to the mu Opioid Receptor. *Molecules*. 2020;25. doi:10.3390/molecules25092087
76. Spetea M, Schmidhammer H. Opioids and Their Receptors: Present and Emerging Concepts in Opioid Drug Discovery. MDPI; 2020.
77. McClung CA. The molecular mechanisms of morphine addiction. *Rev Neurosci*. 2006;17: 393–402.
78. Calvo-Mosquera G, Gonzalez-Cal A, Martinez-Nieto GA, Pita-Pardo L, Calvo-Rodriguez D, Primucci CJ, et al. Un “veneno” para el dolor. El ziconotide. *Farm Aten Primaria*. 2012;10: 63–67.
79. McGivern JG. Ziconotide: a review of its pharmacology and use in the treatment of pain. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2007;3: 69–85.
80. Xu Q, Yaksh TL. A brief comparison of the pathophysiology of inflammatory versus neuropathic pain. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2011;24: 400–407.
81. McGowan E, Hoyt SB, Li X, Lyons KA, Abbadie C. A peripherally acting Na(v)1.7 sodium channel blocker reverses hyperalgesia and allodynia on rat models of inflammatory and neuropathic pain. *Anesth Analg*. 2009;109: 951–958.

82. Amir R, Argoff CE, Bennett GJ, Cummins TR, Durieux ME, Gerner P, et al. The role of sodium channels in chronic inflammatory and neuropathic pain. *J Pain*. 2006;7: S1–29.
83. Gould HJ 3rd, England JD, Soignier RD, Nolan P, Minor LD, Liu ZP, et al. Ibuprofen blocks changes in Na^v 1.7 and 1.8 sodium channels associated with complete Freund's adjuvant-induced inflammation in rat. *J Pain*. 2004;5: 270–280.
84. Coggeshall RE, Tate S, Carlton SM. Differential expression of tetrodotoxin-resistant sodium channels Nav1.8 and Nav1.9 in normal and inflamed rats. *Neurosci Lett*. 2004;355: 45–48.
85. Nassar MA, Stirling LC, Forlani G, Baker MD, Matthews EA, Dickenson AH, et al. Nociceptor-specific gene deletion reveals a major role for Nav1.7 (PN1) in acute and inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101: 12706–12711.
86. Villarreal CF, Sachs D, Cunha F de Q, Parada CA, Ferreira SH. The role of Na(V)1.8 sodium channel in the maintenance of chronic inflammatory hypernociception. *Neurosci Lett*. 2005;386: 72–77.
87. Yeomans DC, Levinson SR, Peters MC, Koszowski AG, Tzabazis AZ, Gilly WF, et al. Decrease in inflammatory hyperalgesia by herpes vector-mediated knockdown of Nav1.7 sodium channels in primary afferents. *Hum Gene Ther*. 2005;16: 271–277.
88. Strickland IT, Martindale JC, Woodhams PL, Reeve AJ, Chessell IP, McQueen DS. Changes in the expression of NaV1.7, NaV1.8 and NaV1.9 in a distinct population of dorsal root ganglia innervating the rat knee joint in a model of chronic inflammatory joint pain. *Eur J Pain*. 2008;12: 564–572.
89. Amaya F, Wang H, Costigan M, Allchorne AJ, Hatcher JP, Egerton J, et al. The voltage-gated sodium channel Na(v)1.9 is an effector of peripheral inflammatory pain hypersensitivity. *J Neurosci*. 2006;26: 12852–12860.
90. Lindia JA, Köhler MG, Martin WJ, Abbadie C. Relationship between sodium channel NaV1.3 expression and neuropathic pain behavior in rats. *Pain*. 2005;117: 145–153.
91. Hoyt SB, London C, Ok H, Gonzalez E, Duffy JL, Abbadie C, et al. Benzazepinone Nav1.7 blockers: potential treatments for neuropathic pain. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007;17: 6172–6177.
92. Zhang X-F, Shieh C-C, Chapman ML, Matulenko MA, Hakeem AH, Atkinson RN, et al. A-887826 is a structurally novel, potent and voltage-dependent Na(v)1.8 sodium channel blocker that attenuates neuropathic tactile allodynia in rats. *Neuropharmacology*. 2010;59: 201–207.
93. Brenes E, Gómez A. Scorpions maintenance in captivity for venom extraction purposes in Costa Rica. *Rev Biol Trop*. 2016;64: 1019–1027.
94. Mercado-Reyes J, Almanza A, Segura-Chama P, Pellicer F, Mercado F. D2-like receptor agonist synergizes the μ -opioid agonist spinal antinociception in nociceptive, inflammatory and neuropathic models of pain in the rat. *Eur J Pharmacol*. 2019;853: 56–64.

12 Anexos

Anexo I. Composición lipídica de membrana compleja

Composición lipídica de membrana compleja para simulación de subunidad α del hNav1.6		
	Membrana superior	Membrana inferior
FOSFATIDILCOLINA	76	51
FOSFATIDIETANOLAMINA	36	67
ESFINGOMIELINA	29	9
FOSFATIDILSERINA	NA	32
GLICOLIPIDOS	9	NA
CEREBROSIDOS	26	NA
FOSFATIDILINOSITOL	NA	17
ACIDO FOSFATIDICO	NA	1
CERADIMA	3	3
DYACILGLICEROL	1	1
COLESTEROL	150	149

Información tomada de Ingolfsson and Carpenter et al en el 2017 [56].

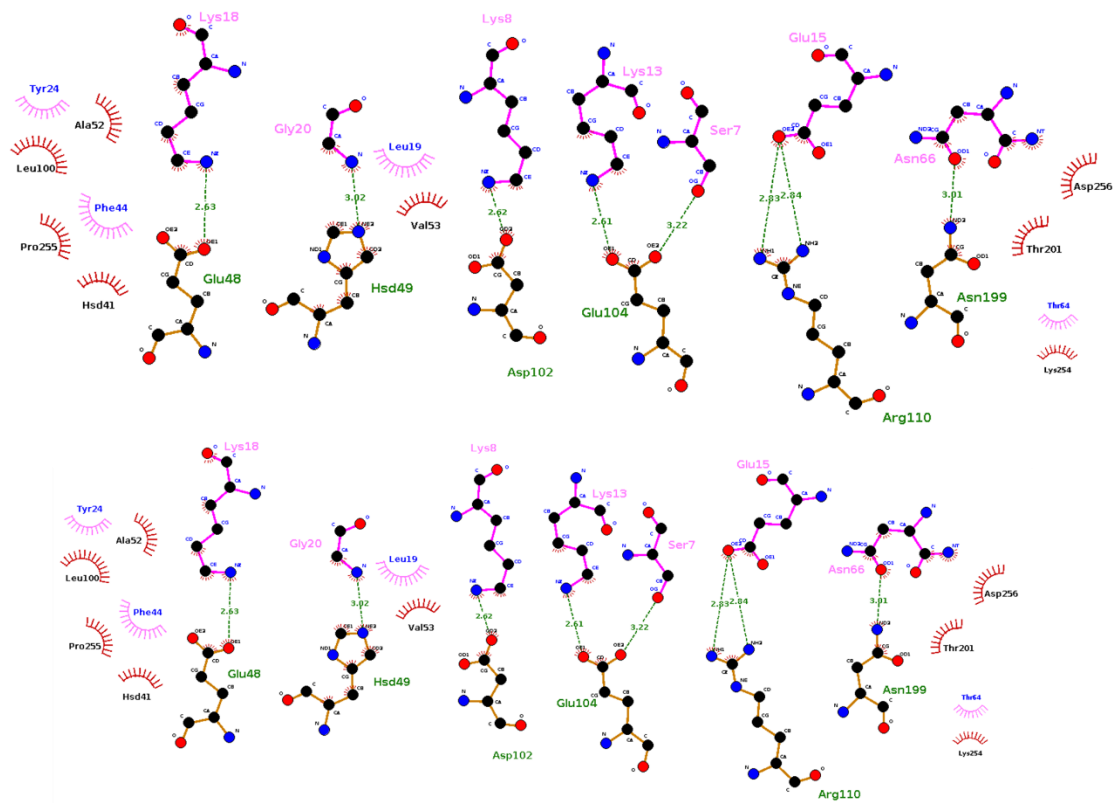
Anexo II. Oligos mutagénicos para producción de variantes peptídicas de HisrCssII-RCR

Mutante	Fw No overlapping 5'-3'	nt	Tm (C°)	Rv No overlapping 5'-3'	nt	Tm (C°)	Fw Sobrelape	pb	Rv Sobrelapante	pb	Primer-primer Overlapping	nt	Tm (C°)
R64T	AGTAACTGCAGCCCAAGCTT AATTAGCTGAG	30	63.7	AAGGGCCAGACCCTGC TTG	21	64.5	CCTAATAAACCTGCCGCTAGTAACT GCAGCCAAAGCTTAATTAGCTGAG	49	AGGGCAGGTTTTATTAGGAA GGGGCCAGACCCTGCTTG	40	CC TAA TAA AAC CTG CCG C	18	54.6
R66D	TGCAGCCCAAGCTTAATTAGC TGA	23	59.9	TATTAGGAAGGGGCCAGAC CA	21	59.7	AAACCTGCAGCTAGTAACTGCAGCC AAGCTTAATTAGCTGA	41	GTTACTAGTGCAGGTTTTATT AGGAAGGGGCCAGACCA	39	AAACCTGCAGC TAGTAA C	18	50.8
Del_A	CGCGAATGCAAAACAGCAGT ACGGAAAAAGC	30	67.4	ATTGTTATTGCAGCCTGTG CTCTTGCTTACC	32	67.3	GCCTTAAAAACGGGTATTGCTGCG CGAATGCAAAACAGCAGTACGGAAA AAGC	53	CAGGCAATACGCGTTTTTAAGG CATTGTAATTTGCAGCCTGTGC TCTTGCTTACC	5	GC CTT AAA AAC GCG TA TTG CCT G	23	60.0
EE	xxx	29	60.4	xxx	24	61	AGAGCGAGGAGTGCAATACGAATG CCTTAAATTGGGAGTAACG	45	TTGCACTCTGGCTCTTGTCTTA CCAGATAGCCCTCTTTCC	40	xxx	16	54.4

Anexo III. Interacciones moleculares para los complejos toxina/receptor.

Anexo III-A. Puentes de hidrogeno a lo largo de la simulación del complejo nCssl/Sitio 4 del hNav1.6

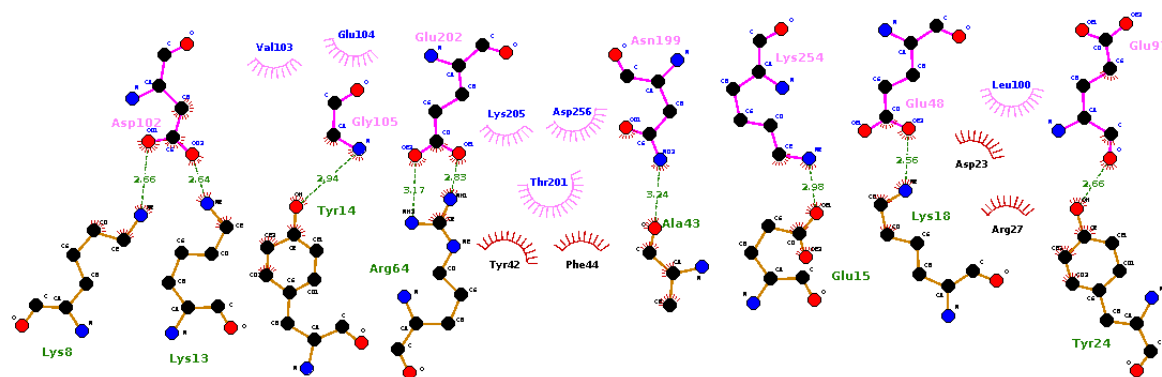
Donador	Aceptor	Ocupación
ASN66-Side	ASP256-Side	10.96%
SER7-Side	GLU104-Side	14.05%
GLY20-Main	HSD49-Side	15.23%
THR64-Side	ASN198-Side	10.03%
SER9-Side	GLU104-Side	12.23%
ASN66-Side	ASN198-Main	1.23%



Anexo III-B. Mapa bidimensional de Interacciones para el complejo nCssl/sitio 4 del canal hNav1.6

Anexo III-C. Puentes de hidrogeno a lo largo de la simulación del complejo rCsslI-RCR/Sitio 4 del hNav1.6

Donador	Aceptor	Ocupación
SER7-Side	GLU104-Side	14.31%
TYR14-Main	GLU104-Side	10.81%
ARG66-Side	ASP263-Side	12.79%
ARG64-Side	GLU262-Side	23.42%
ARG253-Side	ARG66-Side	9.74%
TYR42-Side	GLU204-Side	4.00%



Anexo III-D. Mapa bidimensional de Interacciones para el complejo rCsslI-RCR/sitio 4 del canal hNav1.6

Anexo IV. Rendimiento de las variantes peptídicas de HisrCssII-RCR

variantes peptídicas de rCssII-RCR.				
Variante	Secuencia	PM Exp. Oxidada (Da)	Dif. PM (Da)	Rendimiento por 1L de medio LB Péptido plegado
	MRGSHHHHHGSIEGR-TOXINA			
rCssII-RCR	KEGYLVSKSTGCKYECLKLGDNDYCLRECKQQYGKSSGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWPLPNKRCR	9489.88	0.1	5.2 mg
rCssII-TCR	KEGYLVSKSTGCKYECLKLGDNDYCLRECKQQYGKSSGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWPLPNKTCR	9434.78	0.08	6.4 mg
rCssII-TCD	KEGYLVSKSTGCKYECLKLGDNDYCLRECKQQYGKSSGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWPLPNKTC	9394.68	1.08	4.9 mg
rCssII-Del-D23A-RCR	KEGYLVSKSTGCKYECLK- - - NAYCLRECKQQYGKSSGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWPLPNKRCR	9161.05	0.35	4.2 mg
rCssII-Del-D23A-TCD	KEGYLVSKSTGCKYECLK- - - NAYCLRECKQQYGKSSGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWPLPNKTC	9064.91	0.62	4.1 mg
rCssII-S7R-Del-D23A-RCR	KEGYLVKSTGCKYECLK- - - NAYCLRECKQQYGKSSGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWPLPNKRCR	9132.68	0.72	4.2 mg
rCssII-EE-RCR	KEGYLVSKSEECKYECLKLGDNDYCLRECKQQYGKSSGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWPLPNKRCR	9589.86	0.06	4.3 mg
rCssII-EE-TCD	KEGYLVSKSEECKYECLKLGDNDYCLRECKQQYGKSSGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWPLPNKTC	9494.47	0.8	4.7 mg



Characterization of the coupling mechanism of scorpion β -neurotoxins on the voltage-gated sodium channel hNav1.6

Pavel Andrei Montero-Dominguez and Gerardo Corzo 

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca Mor, México

Communicated by Ramaswamy H. Sarma

ABSTRACT

Scorpion β -neurotoxins represent a pharmacological group that affects voltage-gated sodium channels (Nav). Despite knowing the electrophysiological effect of these toxins on Nav channels, the molecular mechanism by which the union is carried out is still undetermined. In this study, computational techniques such as modeling, docking and molecular dynamics were used to elucidate the mechanism of interaction between scorpion β -neurotoxins using the neurotoxin nCssl and its recombinant variant Cssl-RCR, which bind to the site-4, an extracellular receptor, of the human sodium channel hNav1.6. Different modes of interaction were observed for both toxins, where the main distinguishing feature was the interaction generated by the residue E15 on such site-4; that is, E15 in nCssl exhibits an interaction with the voltage-sensing domain II, and the same residue E15 of Cssl-RCR exhibits an interaction with domain III. Despite this difference in interaction by E15, it is seen that both neurotoxins interact with similar regions of the voltage sensing domain such as the S3-S4 connecting loop (L834-E838) of the hNav1.6. Our simulations present a first approach to the mode of interaction of scorpion beta-neurotoxins in toxin-receptor complexes, being able to explain at the molecular level the phenomenon of voltage sensor entrapment generated by these toxins.

ARTICLE HISTORY

Received 17 November 2022
Accepted 12 February 2023

KEYWORDS


Scorpion-toxin; voltage gated sodium channel; homology modeling; molecular docking; molecular dynamics

Introduction

Voltage-gated sodium channels (Nav) are important transmembrane proteins for the maintenance of cellular homeostasis, when these channels fail, it results in the incidence of different channelopathies. Thus, Nav are important molecular targets for the development of different therapeutic treatments (Chahine, 2018). The neurotoxins in scorpion venoms are widely used as tools for the study and modulation of Navs. Particularly, scorpion β -neurotoxins are short peptides between 60 and 80 amino acids whose structure folding is formed by four beta sheets and an alpha helix stabilized by four disulfide bridges (Rodríguez de la Vega & Possani, 2005). Scorpion β -neurotoxins can interact with Navs by binding to site 4, a Nav receptor formed mainly by the voltage sensing of domain II and the extracellular residues of domain III (Cestèle et al., 1998; Zhang, 2011; Zhang et al., 2012). The binding of scorpion β -neurotoxins to such site 4 causes the reduction of the maximum peak current and the Nav activation to more negative potentials, the latter effect being mediated by the voltage sensor trapping mechanism (Cestèle et al., 1998). Despite knowing the electrophysiological effects caused by these neurotoxins, the molecular mechanism by which these peptides bind to the Nav remains unsolved. nCssl is a β -neurotoxin that has an amidation at its C-terminal, exhibiting the ability to modulate the hNav1.6

(Martin et al., 1987; Saucedo et al., 2012). In 2007, Estrada et al. expressed recombinantly the neurotoxin rCssl (the nCssl without amidation); however, they observed that the affinity and activity of rCssl (Ki 1.5 nM) was 15-fold lower than that of the native toxin (nCssl, Ki 0.1 nM), concluding that the C-terminal is important for the neurotoxin-channel interaction (Estrada et al., 2007). Because of this, in 2011 Estrada et al. added positive charges to the C-terminal of rCssl to obtain the variant Cssl-T64R/N66R, named Cssl-RCR. In this study, the fractional amplitude of the Boltzmann area, corresponding to the toxin binding to the Nav, was used to compare the activity of Cssl-RCR with that of the nCssl. Both peptides nCssl and Cssl-RCR produced the same fractional amplitude of the toxin-bound area when binding to the Nav, showing the characteristic β -neurotoxin effect to shift the voltage dependence channel activation to more negative potentials (Estrada et al., 2011). Therefore, our work here was centered mainly in comparing the interaction between nCssl and Cssl-RCR on site 4 of the hNav1.6. The first approach was to elucidate the mode of interaction of these β -neurotoxins, and to explain the role of the C-terminal region in the interaction with the hNav1.6 at the molecular level. Also, it is proposed a molecular mechanism of the voltage sensor trapping mediated by this type of toxins.

CONTACT Gerardo Corzo  gerardo.corzo@ibt.unam.mx  Institute of Biotechnology, UNAM, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos 62210, México

 Supplemental data for this article can be accessed online at <https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2181629>.

© 2023 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group



* Means that the C-terminal is amidated (CONH₂).

Figure 1. Sequence alignment of native toxin nCsslI, and the recombinant proteins rCsslI y rCsslI-RCR.

Computational methods

Homology modeling

The amino peptide sequence of the hNav1.6 channel was extracted from the UNIPROT database (UniProt Consortium, 2021) (ID: Q9UQD0) and used as input to generate a total of 10,000 three-dimensional models using MODELLER (Webb & Sali, 2016). Since scorpion β -neurotoxins require a strong depolarizing pre-pulse for voltage sensor trapping, the hNav1.7 channel (PDB ID: 6j8j), with an identity of 76.1% to the hNav1.6, was used as a template for the final model toxin-channel, which represent the voltage sensor domain of site 4 in a depolarized state guaranteeing the correct ion channel state for toxin binding. To make the modeling more unfeigned, a PSI-TCOFFE (Notredame et al., 2000) alignment was generated to properly splice conserved domains and residues between the query sequence and the template. The best models were selected by correlating the RMSD values with respect to the template, with the DOPE score generated for each model (Modeller output), selecting the 10 models closest to the median of these parameters. Finally, we use the geometric quality values of each structure to select a representative model. The channel structure was truncated, keeping only the beta neurotoxin binding site 4, which comprises residues 735-874 for the voltage sensor and 1314-1475 for domain III.

Construction of systems and minimization

Site 4 of the hNav1.6 channel was inserted into a POPC membrane (150 \times 150) using CHARMM-GUI (Li et al., 2021). The nCsslI toxin structure was obtained from the PDB (ID: 2LI7), while the CsslI-T64R/N66R variant was constructed using the PyMol mutagenesis tool (Figure 1). The amidation of nCsslI was generated by GROMACS (Abraham et al., 2015). All systems were equilibrated using NVT assembly, preceded by a NPT assembly, until maintaining a temperature of 298°K (Nose-hoover (Evans & Holian, 1985)) and a pressure of 1 atm (Parrinello-Rahman (Parrinello & Rahman, 1981)). All simulations were performed under periodic boundary conditions, long-range electrostatic interactions were computed using the particle-mesh Ewald algorithm (Darden et al., 1993). All interactions were adjusted to 1.2 Å with an integration time of 2fs by writing the trajectory every 10ps. Each system was simulated for 200 ns with a NaCl concentration of 0.15 M, using the Tip3P water model and employing the CHARMM36m (Huang & MacKerell, 2013) all atom force field. The simulations were done with GROMACS v2021.2. on 64 processors. The

trajectories were analyzed with the GROMACS and VMD packages (Humphrey et al., 1996).

Molecular docking

Once the structures were minimized, the electrostatic potential maps were calculated for each minimized model using APBS (Jurrus et al., 2018). Since the regions of importance in the binding of scorpion β -neurotoxins to the sodium channels are known, as well as some residues of such β -neurotoxins, we proceeded to carry out the molecular coupling using Haddock (van Zundert et al., 2016). The molecular coupling was guided through the experimental information of connecting loops of site 4 of the channel such as the S1-S2 (773-780) and S3-S4 (833-844) regions (Cestèle et al., 1998; Zhang, 2011) of the voltage sensing domain as well as the extracellular loop of domain III (1427-1430) (Zhang et al., 2012). The connecting loop regions S1-S2 and S3-S4 were considered flexible loop regions. On the other hand, for neurotoxins, the residues E15, L19, N22, Y24, R27, E28, Q32, Y40, Y42, F44 and W58 were kept up as conserved amino acids, along the sequence of beta neurotoxins, of interaction with the channel (Cohen et al., 2005). Haddock presents an annealing simulation minimization protocol, which generates changes in the secondary structure of the transmembrane segments (not seen in our simulations) with respect to the initial structure. As a result, the RMSD of the transmembrane segments of the receptor, here RMSD < 3 Å with respect to the initial structure, was used as the first screening step to filter the clusters generated by Haddock. Subsequently, the buried surface area of the toxin-receptor complexes was used to select the best model for each cluster. Next, the free energy of binding was calculated using PRODIGY (Vangone & Bonvin, 2017) for the selection of the most favorable docking-pose, using as a final criterion the correct adequacy of the experimental information with the complex best scored by prodigy.

Molecular dynamics simulations and binding energy calculation

The best complex was embedded in the POPC bilayers (150 \times 150) and simulated by 200 ns molecular dynamics at 298°K with 0.15 M NaCl using the parameters mentioned above in the "construction of systems and minimization" section. Once the trajectories were generated, the most populated clusters were obtained using the gmx clusters command using the gromos algorithm (Daura et al., 1999). All the images that make up the 10 most representative clusters (1500-2000 images) were selected and the free energy of

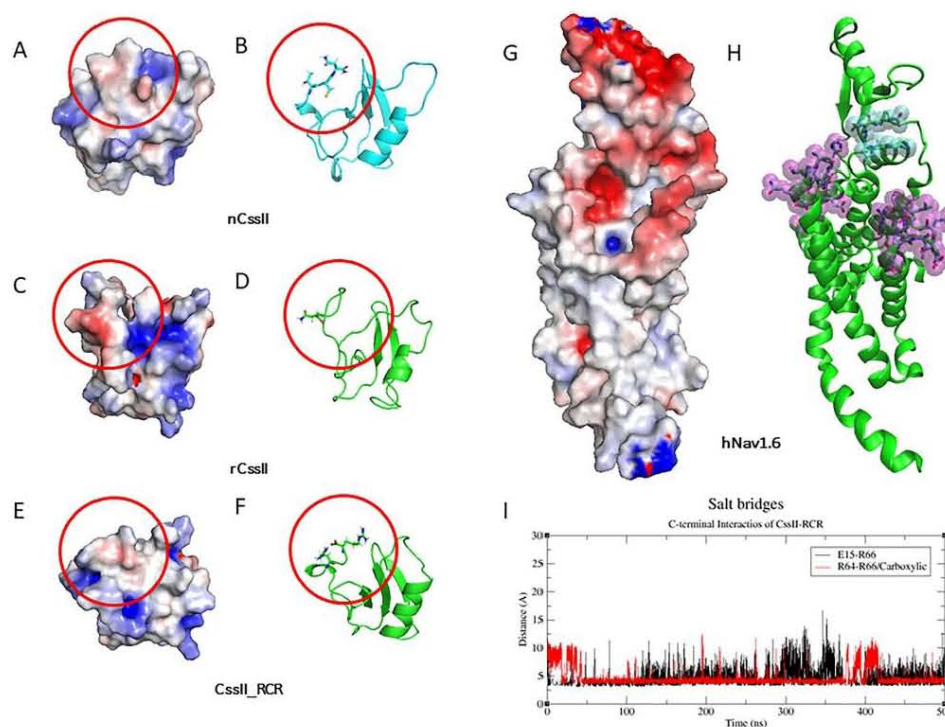


Figure 2. Electrostatic potential maps for the generated models. nCsslI toxin (A and B), rCsslI toxin (C and D), CsslI-RCR toxin (E and F). Site 4 of the hNav1.6 channel (G and H). Toxin CsslI-RCR intrachain interactions (I).

binding was calculated for each image through PRODIGY (Vangone & Bonvin, 2017), averaging all the energies calculated for each variant.

Results and discussion

Molecular modeling and docking

The final structural model of site 4 on hNav1.6 was obtained from a correlation between the DOPE score and the backbone RMSD, selecting the models closer to the median of these parameters. The final model exhibited a geometric quality value of 94.9% of the main chain, presenting only three residues in the disallowed regions. These last three residues are displayed in the connecting loop, but they are not part of any structured region. Since the connecting loops are flexible regions, it was decided to continue with the equilibrium step with the explicit solvent (Figure S1 in supplementary materials). Non-structural alterations of transmembrane segments were observed during the equilibration of the truncated structure of site 4 on the hNav1.6 in POPC membranes (Figures S2 and S3 in the supplementary material section). Molecular modeling of rCsslI shows a negative charge distribution in the area corresponding to its C-terminal (Figure 2C, D), contrary to the C-terminal of nCsslI (Figure 2A,

B) and CsslI-RCR (Figure 2E, F). This contrast is associated with the exposure of the C-terminal carboxyl group to the extracellular medium. On the other hand, CsslI-RCR presented a neutral charge distribution like that of the nCsslI amidated toxin. This neutral charge distribution was generated by the formation of a saline interaction by residue R64 with the terminal carboxyl group of the toxin, this interaction being stable during 500 ns of simulation (Figure 2I). This charge distribution at the C-terminus is associated with an important interaction zone for binding to the hNav1.6. It is observed that the charge distribution on the surface of site 4 is negatively charged (Figure 2G, H). We hypothesized that the negatively charged C-terminal region for the rCsslI variant may be preventing toxin coupling through an electrostatic repulsion effect with the site 4 of the channel. This idea agrees and it could be explained for the low affinity and effect of rCsslI for the Nav reported by Estrada et al. (2007, 2011). Therefore, because of the low affinity and the electrostatic distribution of rCsslI in comparison to that of nCsslI or CsslI-RCR, it was decided to explore only the interaction of nCsslI and CsslI-RCR with the hNav1.6, which presented similar affinity in such study (Estrada et al., 2011). Molecular docking showed that nCsslI and CsslI-RCR present similar regions of binding to site 4 of the channel. Being the region of the C-terminal and the N-terminal the main sites of

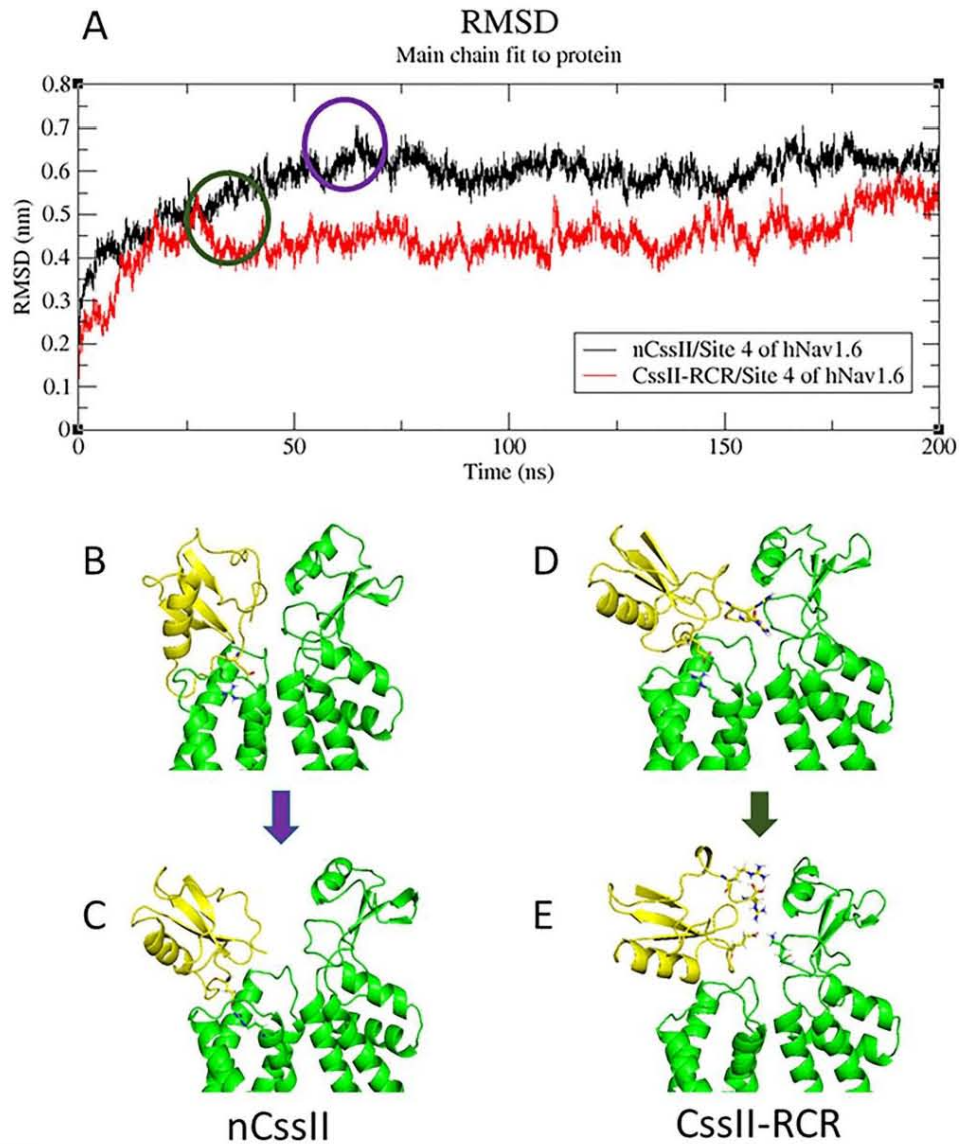


Figure 3. Initial and final coupling modes of β -neurotoxins on site 4 of the hNav1.6 channel. RMSD during simulation for nCssII/hNav1.6 and CssII-RCR/hNav1.6 complexes (A). Initial (B) and final (C) coupling modes of the nCssII toxin on the hNav1.6 channel. Initial (D) and final (E) docking modes of the CssII-RCR toxin on the hNav1.6 channel.

interaction. A remarkable feature in both docking poses was the interaction presented by the residue E15 with that R844 residue from the voltage sensor of the hNav1.6, the latter being able to correlate with the mechanism of voltage sensor trapping presented by these toxins (Cestèle et al., 1998; Cohen et al., 2005).

Mode of interaction of beta-neurotoxins

It was observed, during our simulations, that both toxins nCssII and CssII-RCR presented a rearrangement on site 4 of the hNav1.6 channel different from the initial docking pose (Figure 3A). This rearrangement generated new forms of

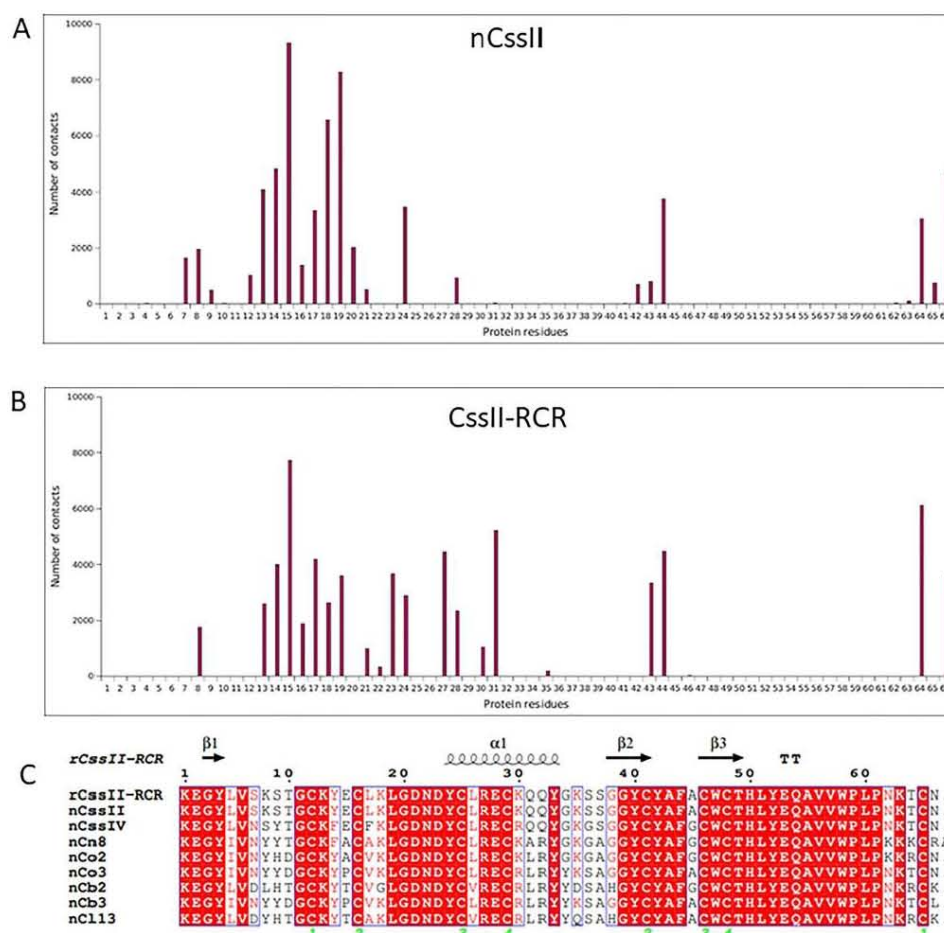


Figure 4. Number of contacts present for each toxin on site 4 of the hNav1.6 channel. Number of contacts generated by each n*CsslI* toxin residue (A). Number of contacts generated by each *CsslI*-RCR toxin residue (B). Sequence alignment of known toxins from venom of species of the genus *Centruroides* (C).

union by both toxins on site 4, presenting a final RMSD between both couplings of 5.7 Å (Figure 3B–E). Both toxins n*CsslI* and *CsslI*-RCR presented similar interactions with the voltage sensor domain and the extracellular section of domain III. Although this is not the first study that shows the molecular interaction of scorpion β -neurotoxins in hNavs. Chen and Chung (2012) did not take into account the domain III in the molecular description of the interaction toxin-receptor. This work shows the first approach for exploring the value of including the extracellular section of domain III in the binding of the scorpion β -neurotoxins on the site 4 of hNavs. A distinctive feature among these new ways of interacting was the interaction formed by the residue E15. n*CsslI* presented an interaction of E15 with the residue R844 of the voltage sensor (Figure 3C). This is in contrast to the

CsslI-RCR variant, which presents an interaction with residue K1427 of domain III (Figure 3E). It was observed that this lack of interaction by E15 in *CsslI*-RCR is due to the formation of an intrachain salt bridge between this residue with residue R66 (Figure 2I). This interaction orients the E15 residue towards the C-terminus of the toxin. Being the final exposure of E15 towards domain III of the Nav1.6 (Figure 3E).

Both n*CsslI* and *CsslI*-RCR presented similar interaction residues with the hNav1.6 channel (Figure 4A, B). These residues involve the N- and C-terminal regions as well as intermediate amino acids from the 42–44 region. The latter is reported as conserved and important in the affinity of β -neurotoxins from venoms of scorpions of the genus *Centruroides* (Cohen et al., 2005). While the C-terminal of n*CsslI* and *CsslI*-RCR presents the same interaction residues as is the region 64–66, the main

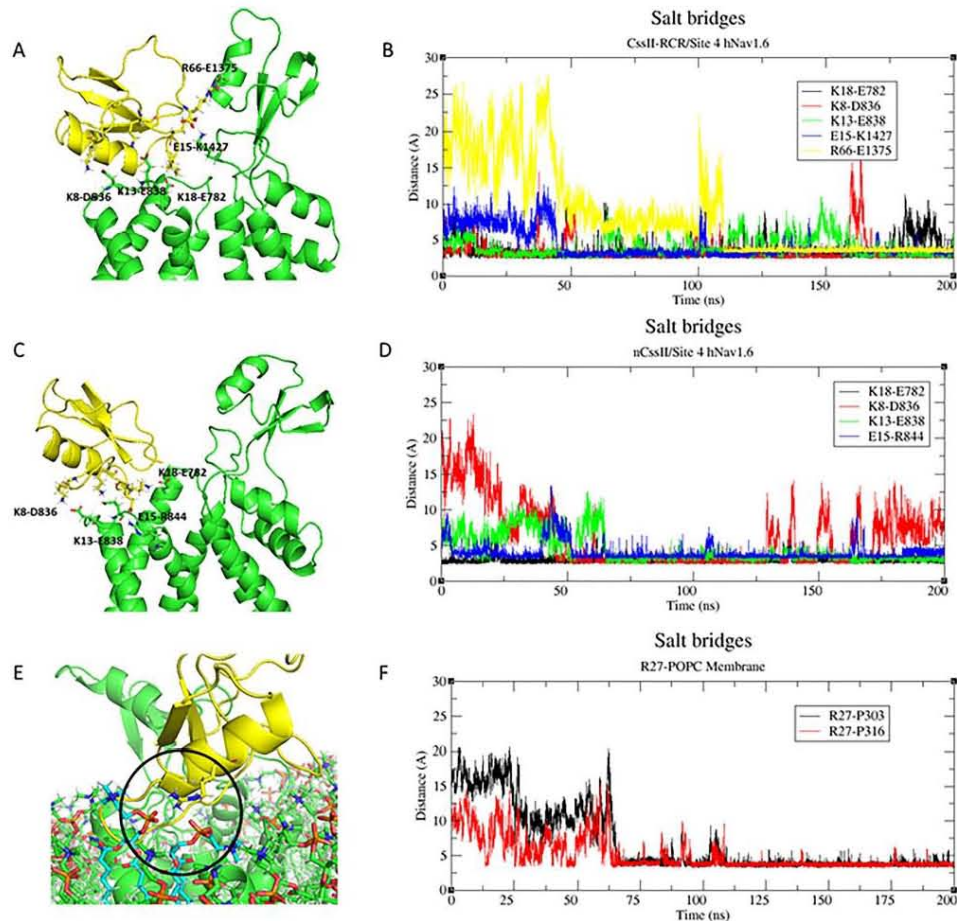


Figure 5. Salt interactions generated by scorpion β -neurotoxins on site 4 of the hNav1.6 channel. Salt interactions generated for the CsslI-RCR complex/site 4 of hNav1.6 (A and B). Salt interactions generated for the nCsslI/site 4 complex of hNav1.6 (C and D). Salt interaction formed R27 of the nCsslI toxin with the phosphate groups of the membrane (E and F).

difference in the distribution of contacts of both toxins was shown in residues of the N-terminal region. Although both toxins presented similar binding energies (nCsslI: -6.64 ± 0.26 kcal/mol and CsslI-RCR: -6.86 ± 0.48 kcal/mol), a greater distribution of contacts was observed throughout the sequence of CsslI-RCR in contrast to nCsslI. This difference in contact distribution was due to the way each toxin interacts with site 4 of the hNav1.6. Despite this, all the interaction residues shown by each peptide were within the conserved and important residues (pharmacophore region) for the activity of beta-neurotoxins from the genus *Centruroides* (Cohen et al., 2005). Despite the diversity of interactions shown by both toxins, the residues reported as important in the peptide-channel interaction by the receptor are mainly of polar nature. Due to this, it was decided to carry out the analysis of the polar residues between the toxin with the hNav1.6.

Polar interactions of toxin-site 4 complexes

Both toxins nCsslI and CsslI-RCR presented similar ionic interactions, observing the formation of three stable salt bridges with the site 4 voltage sensor. These interactions were E782-K18, D836-K8 and E838-K13, observing that the localization of residue E782 is in segment S2 and residues D836 and E838 on the connecting loop of segments S3 and S4 (Figure 5A–D). Despite presenting the same ionic interactions with the voltage sensing domain II, the main difference between both toxins was in the formation of ionic interactions with domain III. Although the CsslI-RCR variant does not present the E15-R844 interaction, as shown by the nCsslI toxin, it exhibits two extra salt interactions such as E15-K1427 and R66-E1375 (Figure 5A, B). These interactions presented by E15 and R66 of the CsslI-RCR could be related to the recovery of the affinity of the

Table 1. Hydrogen bonds of complexes.

Hydrogen bond	Toxin/Nav interaction	Occupancy (%)
nCssl/Site 4 of hNav1.6		
Ser7-Side	Glu838-Side	14.0
Ser9-Side	Glu838-Side	12.2
Tyr14-Main	Glu838-Side	5.9
Gly20-Main	His783-Side	15.2
Thr64-Side	Asn1371-Side	10.0
Asn66-Side	Asn1371-Main	6.2
Asn66-Side	Asp1429-Side	10.9
Cssl-RCR/Site 4 of hNav1.6		
Tyr14-Main	Glu838-Side	10.8
Lys18-Side	Met777-Main	15.8
Tyr24-Side	Glu831-Side	14.7
Arg64-Side	Asn1372-Side	23.4
Arg64-Side	Thr1374-Side	15.5

non-amidated rCssl by the Cssl-RCR variant reported by Estrada et al. (2011) allowing the formation of these bonds with domain III, the stabilization of the toxin on its binding site, and improving the trapping of the voltage sensor as reported for other toxin-channel complexes such as in CsslV-Nav1.2 (Zhang et al., 2012). On the other hand, it was observed that nCssl also presented other interactions different from DII, such as the interaction formed by the residue R27. This highly conserved residue in scorpion β -neurotoxins is important in the binding affinity of CsslV-Nav1.2 complex (Figure 4C) (Cohen et al., 2005) but did not present direct interaction with the hNav1.6. However, it could be seen that the guanidine group of R27 was oriented towards the membrane during the rearrangement of the toxin during the simulation. This rearrangement allowed the formation of salt interactions by the guanidine group of R27 with the phosphate groups of the membrane, these interactions being highly stable for the rest of the simulation (Figure 5C, E, F).

This phenomenon of interaction by the toxin with the membrane is not new, since there are currently reports of the importance of the membrane in the stabilization of toxin-receptor complexes (Xu et al., 2019). This result is a first approach to atomic model detail of membrane-mediated dynamics and stabilization of toxin-receptor complexes. On the other hand, the distribution of hydrogen bonds was located for both toxins mainly at the N- and C-terminal regions (Table 1 and Figure S4 of supplementary material). Observing that the main difference between nCssl and Cssl-RCR was in the interaction residues located in the N-terminal. Despite this difference, the regions with which the toxin residues interact belong mainly to the S3-S4 connecting loop and to domain III, concluding that both regions are important for the formation of the neurotoxin-channel complex.

Voltage sensor trapping

Scorpion β -neurotoxins can move activation potentials to more negative potentials by a mechanism described by Cestèle et al. as voltage sensor trapping (Cestèle et al., 1998). This mechanism suggests that the toxin acts directly on the voltage sensor by holding it in a conformation that facilitates early activation of the channel. Although both toxins presented different ways of interacting with the channel (RMSD 5.7 Å), they presented similar regions of interaction, by the

N-terminus of the toxin, with the voltage sensing domain. It was observed that a good part of the interactions exhibited by each toxin were located on the connecting loop S3-S4. The main amino acids exposed by this connecting loop, such as L834, D836 and E838, are the main ones involved in the peptide-channel interaction (Figures S4A and S4B in the supplementary material section). The main difference between the binding models of nCssl and rCssl-RCR was the interaction generated by the E15 residue. This residue is highly conserved in scorpion β -neurotoxins, and it has been reported to be important for voltage sensor trapping in the CsslV-hNav1.2 complex (Cohen et al., 2005). While nCssl exhibited the residue E15 interacting with the first gating charge R844 of the voltage sensor segment of the domain II, the Cssl-RCR variant does not present the E15-R844 interaction. Despite the relevance of E15 reported by Cohen et al. (2005), there are reports of scorpion β -toxins with the ability to trap the voltage sensor without the presence of this residue (García-Guerrero et al., 2020; Schiavon et al., 2012). For example, the scorpion β -neurotoxins Cn8 and Co2, shown in Figure 4C, have the ability to trap the voltage sensor of different ion channels such as hNav1.1, hNav1.2 and hNav1.6 (García-Guerrero et al., 2020; Schiavon et al., 2012). Cn8 and Co2 contain an A15 residue instead of E15 (Figure 4C); therefore, the E15 interaction with the hNav is not always necessary for voltage sensor trapping. Scorpion β -toxins such as Cn8 and Co2 are capable to interact in different way to the site 4. Due to the similar mode of interaction exhibited by nCssl and rCssl-RCR, in this work, we consider that the voltage sensor trapping could occur through the interaction of the N-terminal region of these toxins with the residues located in the loop of the S3 and the voltage sensor segment S4. We suggest the existence of regions in the site 4 that stabilize the toxin-ion channel complex as the segment S2 and the extracellular section of domain III, allowing the correct interaction of the toxin with the connecting loop S3-S4. Achieving this to maintain the voltage sensing segment in an outward conformation that leads the opening of the channels to more negative potentials.

Conclusions

Our simulations show that the C-terminus of the scorpion β -neurotoxins is oriented towards domain III of site 4 of the Nav. Being able to conclude, based on the maps of electrostatic potential generated for the hNav1.6 channel, the importance of the neutralization of the charge of the C-terminal (carboxyl) of the toxins for an appropriate peptide-receptor interaction. On the other hand, it is observed that the T64R/N66R variant (Cssl-RCR) presented a different mode of interaction with respect to the nCssl (RMSD = 5.7 Å), observing a greater number of interactions by the Cssl-RCR on domain III of site 4. This increase in interactions exhibited by the Cssl-RCR may be related to the recovery of the affinity shown by this variant in the study by Estrada et al. It is appreciated that both toxins present similar interaction residues on the S3-S4 connecting loop, and this interaction may explain the mechanism of the voltage sensor

trapping, by sequestering the connecting loop prior to the S4 segment, keeping it in a depolarized state. On the other hand, both toxins presented interactions with other regions of site-4, which may be involved in the stabilization of the toxin on its receptor, thus allowing a more solid interaction by the toxin on the S3-S4 connecting loop.

Acknowledgements

We acknowledge Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación, DGTIC-UNAM, Proyecto LANCAD-UNAM-DGTIC-376, for computer time at MIZTLI supercomputer. P.A.M-D was a PhD student from Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) under a fellowship from CONACYT.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

P.A.M-D. is a PhD fellow from Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas from Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and he is supported by a PhD scholarship (CVU: 775900) from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Research work was funded by DGAPA-UNAM (grant number IT200321) and by CONACYT-PRONII (grant number 303045).

ORCID

Gerardo Corzo  <http://orcid.org/0000-0002-9513-1622>

Author contributions

P.A.M-D. performed the research. G.C.B. and P.A.M-D. wrote a draft of the paper and the final version.

References

- Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., & Lindahl, E. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1-2, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
- Cestèle, S., Qu, Y., Rogers, J. C., Rochat, H., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1998). Voltage sensor-trapping: enhanced activation of sodium channels by beta-scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II. *Neuron*, 21(4), 919–931. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80606-6](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80606-6)
- Chahine, M. (2018). *Voltage-gated sodium channels: Structure, function and channelopathies*. Springer.
- Chen, R., & Chung, S.-H. (2012). Conserved functional surface of anti-mammalian scorpion β -toxins. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(16), 4796–4800. <https://doi.org/10.1021/jp300127j>
- Cohen, L., Karbat, I., Gilles, N., Ilan, N., Benveniste, M., Gordon, D., & Gurevitz, M. (2005). Common features in the functional surface of scorpion beta-toxins and elements that confer specificity for insect and mammalian voltage-gated sodium channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(6), 5045–5053. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408427200>
- Darden, T., York, D., & Pedersen, L. (1993). Particle mesh Ewald: An N-log(N) method for Ewald sums in large systems. *The Journal of Chemical Physics*, 98(12), 10089–10092. <https://doi.org/10.1063/1.464397>
- Daura, X., Gademann, K., Jaun, B., Seebach, D., van Gunsteren, W. F., & Mark, A. E. (1999). Peptide folding: When simulation meets experiment. *Angewandte Chemie International Edition*, 38(1-2), 236–240. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1521-3773\(19990115\)38:1/2 < 236::aid-anie236 > 3.0.co;2-m](https://doi.org/10.1002/(sici)1521-3773(19990115)38:1/2 < 236::aid-anie236 > 3.0.co;2-m)
- Estrada, G., García, B. I., Schiavon, E., Ortiz, E., Cestele, S., Wanke, E., Possani, L. D., & Corzo, G. (2007). Four disulfide-bridged scorpion beta neurotoxin Cssl: heterologous expression and proper folding in vitro. *Biochimica et biophysica acta*, 1770(8), 1161–1168. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.04.006>
- Estrada, G., Restano-Cassulini, R., Ortiz, E., Possani, L. D., & Corzo, G. (2011). Addition of positive charges at the C-terminal peptide region of Cssl, a mammalian scorpion peptide toxin, improves its affinity for sodium channels Nav1.6. *Peptides*, 32(1), 75–79. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.11.001>
- Evans, D. J., & Holian, B. L. (1985). The nose-hoover thermostat. *The Journal of Chemical Physics*, 83(8), 4069–4074. <https://doi.org/10.1063/1.449071>
- García-Guerrero, I. A., Cárcamo-Noriega, E., Gómez-Lagunas, F., González-Santillán, E., Zamudio, F. Z., Gurrola, G. B., & Possani, L. D. (2020). Biochemical characterization of the venom from the Mexican scorpion *Centruroides ornatus*, a dangerous species to humans. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 173, 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.11.004>
- Huang, J., & MacKerell, A. D. Jr (2013). CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. *Journal of Computational Chemistry*, 34(25), 2135–2145. <https://doi.org/10.1002/jcc.23354>
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 33–38. 27–28. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
- Jurrus, E., Engel, D., Star, K., Monson, K., Brandi, J., Felberg, L. E., Brookes, D. H., Wilson, L., Chen, J., Liles, K., Chun, M., Li, P., Gohara, D. W., Dolinsky, T., Konecny, R., Koes, D. R., Nielsen, J. E., Head-Gordon, T., Geng, W., ... Baker, N. A. (2018). Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Science*, 27(1), 112–128. <https://doi.org/10.1002/pro.3280>
- Li, Y., Liu, J., & Gumbart, J. C. (2021). Preparing membrane proteins for simulation using CHARMM-GUI. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2302, 237–251. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1394-8_13
- Martin, M. F., García y Pérez, L. G., el Ayeb, M., Kopeyan, C., Bechis, G., Jover, E., & Rochat, H. (1987). Purification and chemical and biological characterizations of seven toxins from the Mexican scorpion, *Centruroides suffusus suffusus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(10), 4452–4459. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)61214-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)61214-1)
- Notredame, C., Higgins, D. G., & Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology*, 302(1), 205–217. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4042>
- Parrinello, M., & Rahman, A. (1981). Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied Physics*, 52(12), 7182–7190. <https://doi.org/10.1063/1.328693>
- Rodríguez de la Vega, R. C., & Possani, L. D. (2005). Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 46(8), 831–844. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.09.006>
- Saucedo, A. L., del Rio-Portilla, F., Picco, C., Estrada, G., Prestipino, G., Possani, L. D., Delepiere, M., & Corzo, G. (2012). Solution structure of native and recombinant expressed toxin Cssl from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*, and their effects on Nav1.5 sodium channels. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1824(3), 478–487. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.01.003>
- Schiavon, E., Pedraza-Escalona, M., Gurrola, G. B., Olamendi-Portugal, T., Corzo, G., Wanke, E., & Possani, L. D. (2012). Negative-shift activation, current reduction and resurgent currents induced by β -toxins from *Centruroides* scorpions in sodium channels. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 59(2), 283–293. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.12.003>
- UniProt Consortium. (2021). UniProt: the universal protein knowledge-base in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D480–D489.
- Vangone, A., & Bonvin, A. M. J. J. (2017). PRODIGY: A Contact-based Predictor of Binding Affinity in Protein-protein Complexes. *Bio-protocol*, 7(3), e2124. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2124>

- van Zundert, G. C. P., Rodrigues, J. P. G. L. M., Trellet, M., Schmitz, C., Kastiris, P. L., Karaca, E., Melquiond, A., S. J., van Dijk, M., de Vries, S. J., Bonvin, A., & M. J. J. (2016). The HADDOCK2.2 web server: User-friendly integrative modeling of biomolecular complexes. *Journal of Molecular Biology*, 428(4), 720–725. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.09.014>
- Webb, B., & Sali, A. (2016). Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Current Protocols in Protein Science*, 86, 2.9.1–2.9.37. [<https://doi.org/10.1002/cpp.20>]
- Xu, H., Li, T., Rohou, A., Arthur, C. P., Tzakoniati, F., Wong, E., Estevez, A., Kugel, C., Franke, Y., Chen, J., Ciferri, C., Hackos, D. H., Koth, C. M., & Payandeh, J. (2019). Structural basis of Nav1.7 inhibition by a gating-modifier spider toxin. *Cell*, 176(5), 1238–1239. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.047>
- Zhang, J. Z., Yarov-Yarovoy, V., Scheuer, T., Karbat, I., Cohen, L., Gordon, D., Gurevitz, M., & Catterall, W. A. (2012). Mapping the interaction site for a β -scorpion toxin in the pore module of domain III of voltage-gated Na⁽⁺⁾ channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(36), 30719–30728. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.370742>
- Zhang, Z. (2011). Structure-function map of the receptor site for beta-scorpion toxins in domains II and III of voltage-gated sodium channels.

Anexo VI. Patente en proceso de publicación



Instituto de Biotecnología
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

SECRETARÍA DE VINCULACIÓN
OFICIO IBIT/SV/137/2023
ASUNTO: Se envía documentación para valuación de transferibilidad de invención

DR. JORGE VÁZQUEZ RAMOS
COORDINADOR DE VINCULACIÓN
Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA
PRESENTE

En el grupo del doctor Gerardo Corzo, investigador titular "C" de este Instituto, se ha estado desarrollando la invención denominada "Nuevas variantes de péptidos con actividad analgésica provenientes de neurotoxinas obtenidas mediante expresión heteróloga" misma que requerimos someterán al IMPI como solicitud de patente a inicios del año próximo, por lo que adjunto al presente sírvase encontrar los siguientes documentos:

- Memoria descriptiva de la solicitud de patente, con el grado de avance que se tiene a este momento;
- Formato de "Requisitos para presentación de proyectos que soliciten su protección y transferencia/licenciamiento", debidamente cumplimentado por el Dr. Corzo.

Cabe mencionar que no hay una divulgación previa de esta invención. Por otro lado, esta Secretaría de Vinculación, llevó a cabo el análisis de patentabilidad de la invención, concluyendo que es nueva, inventiva y que por supuesto cuenta con aplicación industrial.

Mucho he de agradecerle que, una vez realizada la evaluación de la transferibilidad de esta invención, nos sea notificado el resultado, para, en su caso, solicitar el pago de los derechos para su registro ante el IMPI. Como siempre, agradezco el apoyo decidido de la Coordinación de Vinculación y Transferencia Tecnológica a su digno cargo.

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para hacerle llegar un saludo cordial.

Atentamente,
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuernavaca, Mor., a 22 de noviembre de 2023.
EL SECRETARIO TÉCNICO

M. EN ADMÓN. MARIO TREJO LOYO

➤ Se anexa lo indicado

Ccp Mtra. Isabel Mascorro Velarde, Directora de Transferencia de Tecnología. Presente
IQ. Salvador Enrique Morales Herrera, Coordinador de Propiedad Intelectual. Presente

MTL

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO - INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
Av. Universidad s/n, Col. Chamilpa C.P. 62210, Cuernavaca, Morelos, México.
Tels. +52 (777) 329 1600 / (55) 56 22 76 00 Fax +52 (777) 317 2388 www.ibt.unam.mx

NUEVAS VARIANTES DE PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD ANALGÉSICA PROVENIENTES DE NEUROTOXINAS OBTENIDAS MEDIANTE EXPRESIÓN HETERÓLOGA

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a la obtención de nuevas variantes de péptidos recombinantes, generados mediante expresión heteróloga en *E. coli*, con actividad antinociceptiva (analgésica), particularmente en mamíferos. Estas variantes peptídicas fueron concebidas en estudios de biología estructural computacional, realizados por los inventores de la presente invención, así como en la información de la secuencia de la toxina Cell8, debido a que esta última tiene la habilidad de modular al canal de sodio relacionado al dolor el hNav.17. Los péptidos recombinantes de la presente invención comprenden las variantes denominadas: HisrCsslI-RCR (SEQ. ID NO: 1), HisrCsslI-TCD (SEQ. ID NO: 2) y HisrCsslI-Del-D23A-TCD (SEQ. ID NO: 3); que no presentaron toxicidad en el modelo murino. Particularmente comprende la variante HisrCsslI-Del-D23A-TCD (SEQ. ID NO: 3), que presentó la actividad de modular el canal hNav1.7, a través de la reducción del pico de corriente máxima. Las variantes de péptidos recombinantes de la presente invención exhibieron actividad antinociceptiva, siendo la variante HisrCsslI-Del-D23A-TCD (SEQ. ID NO: 3) la que presentó un efecto equiparable a un control positivo de analgesia (DAMGO). La variante HisrCsslI-Del-D23A-TCD (SEQ ID NO: 3) presento un efecto analgésico en modelos de dolor inflamatorio y neuropático. La invención también se refiere a las composiciones farmacéuticas que comprenden dichos péptidos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Dolor y analgesia

El dolor es una experiencia sensorial y emocional, generalmente desagradable, asociada a un daño real o potencial del tejido que pueden experimentar todos aquellos seres vivos que disponen de un sistema nervioso. Es una experiencia asociada a una lesión tisular y es un mecanismo que utiliza nuestro organismo para alertarnos acerca de lo que sucede en nuestro alrededor, el tratar de dar una escala de medida exacta al dolor, es prácticamente imposible, ya que se trata de una sensación subjetiva (Buschmann et al., 2002) y debido a esta alta variabilidad, podemos clasificar el dolor de tipo agudo o crónico (Garcia-Fajardo et al., 2010). El dolor de tipo agudo es una experiencia que usualmente es de corta duración y sirve para alertar al organismo acerca de un daño tisular, que al ser percibido por el individuo este toma las medidas protectoras o evasivas necesarias para minimizar el daño. Este tipo de dolor tiende a disminuir conforme pasa el tiempo (McGivern, 2007). Mientras que el dolor de tipo crónico representa una señal anormal que es de amplia duración y aparentemente no tiene ningún uso funcional para un organismo, pero es asociado normalmente con enfermedades

que presentan inflamación de tejidos o daño a neuronas del sistema nervioso central (CNS) o del sistema nervioso periférico (PNS), en algunos de los casos más complejos el dolor crónico puede deberse a una combinación de dolor por inflamación y dolor neuropático (McGivern, 2007). A pesar de que a partir de la década de los 60's se han realizado grandes avances en el estudio del dolor, los tratamientos existentes contra éste no son totalmente eficaces para todos los casos, ya que existen algunos donde el dolor aún no es tratable (Buschmann et al., 2002). Incluso hay algunos padecimientos que siguen siendo manejados de manera equivocada usando medicamentos que ya no son de uso común, los cuales tienen un gran número de efectos secundarios y no una acción específica tales como algunas fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) (Villarejo-Díaz, 2001). Al existir dolor como parte de una sintomatología, el tratamiento general refiere al uso de analgésicos tanto opioides como los fármacos AINES los cuales son administrados principalmente de manera oral o intradérmica. Por definición general los analgésicos son medicamentos utilizados para calmar, tratar y aliviar el dolor (Buschmann et al., 2002). Los medicamentos para el control del dolor se diseñaron para interrumpir las vías de transmisión en sitios específicos, usualmente bloqueando la transmisión de señales. Existen tres sitios principales donde se puede modificar la señal transmisora del dolor, esto puede ocurrir en la periferia, en la médula espinal y en el cerebro. La mayoría de los analgésicos tienen más de un solo sitio de acción. En la espina dorsal la información dolorosa se percibe por medio de células del ganglio dorsal de donde son enviados al cerebro. Las fibras que transmiten estas señales al cerebro tienen terminaciones en diferentes sitios, particularmente la formación reticular, el tálamo y la corteza cerebral. En la formación reticular el estímulo doloroso puede provocar cambios en el ritmo cardíaco, la presión sanguínea, la respiración y otras funciones. Mientras que en el tálamo y la corteza cerebral es donde se genera la apreciación consciente del dolor. Los analgésicos opioides entre los cuales se cuentan algunos de los más potentes actualmente son utilizados para tratar dolores de moderados a severos, sin embargo provocan una serie de efectos secundarios, entre los que se encuentran la generación de resistencia y en ocasiones y como consecuencia de ello se puede generar una farmacodependencia en el paciente. Uno de los analgésicos opioides más conocido es la morfina, la cual aparte de acarrear consigo la fama de narcótico es el estándar contra el cual son comparados los nuevos analgésicos (Schmalhofer et al., 2008). Mientras que los AINES tienen un grado variable de acción analgésica, anti-inflamatoria y anti-pirética, su acción analgésica se encuentra mediada principalmente por su capacidad de prevenir la producción de prostaglandinas, las cuales se encuentran implicadas en la producción de dolor inflamatorio y en la sensibilización de nociceptores. Los AINES producen una serie de efectos secundarios como los daños gastrointestinales y la nefrotoxicidad, entre otros, ya afectan distintos órganos (Buschmann et al., 2002).

Péptidos analgésicos provenientes de animales ponzoñosos

En la actualidad el uso de analgésicos sigue siendo en su mayoría similar al mismo que existía hace ya varias décadas (Livett et al., 2006). Sin embargo en la búsqueda de nuevos fármacos contra el dolor se ha llegado a encontrar moléculas analgésicas en venenos de animales, tal es el caso 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 et al., 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 Conotoxina MVIIA (que pertenece a una familia de Conopéptidos que tienen un tamaño de entre 24 y 29 aminoácidos). La 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 siempre y cuando se administre vía epidural, lo cual es una limitante de este fármaco (McGivern, 2007). El descubrimiento de la actividad analgésica de la 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 en el veneno de la araña *Brachypelma verdezi*, como fue el péptido BvTx47, el cual presentó una estructura beta DDH (direct disulfide hairpin por sus siglas en inglés, o también denominado, rizo guiado por disulfuros). BvTx47 es diferente a los otros péptidos analgésicos reportados de estructura de nudos de cisteínas, como el grupo de las ICK (inhibitor cysteine knot, por sus siglas en inglés, o bien, nudo inhibidor de cisteínas).

Neurotoxinas de alacrán que afectan canales de sodio dependientes de voltaje

Los alacrán tienen aproximadamente 400 millones de años de evolución, siendo la producción de venenos un factor importante en su éxito adaptativo. Este veneno está formado por una mezcla compleja de componentes, siendo las de carácter proteico las de mayor porcentaje, que le permite al animal utilizarlo como mecanismo de depredación así como de

defensa. La mayoría de toxinas, de origen proteico, tienen la capacidad de modular la actividad de los canales iónicos de los organismos envenenados, siendo aquellas toxinas que interactúan con los canales relacionados al sistema nervioso conocidas como neurotoxinas. Las toxinas de alacrán, que modifican la apertura de los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav's), son polipéptidos de un tamaño aproximado de entre 60 a 80 aminoácidos que exhiben un arreglo tridimensional del tipo $\beta\alpha\beta\beta$, siendo estabilizados por cuatro puentes disulfuro. Las neurotoxinas que afectan a los Nav's (NTx-Nav's) se clasifican en α - y β -toxinas dependiendo del efecto electrofisiológico presentado después de su unión al canal (de la Vega & Possani, 2007). Mientras que las α -toxinas alentan el proceso de inactivación rápida, prolongando los potenciales de acción en la célula, las β -toxinas reducen el pico de corriente máxima y mueven la voltaje-dependencia de activación del canal a valores más negativos. La modificación de la cinética de apertura de los Nav's, por parte de estos péptidos tóxicos, tienen como consecuencia graves efectos fisiológicos, tales como alteraciones cardíacas, parálisis y dificultad respiratoria. Siendo la alteración de la dinámica de activación de estos canales la causa de la actividad tóxica y letal por parte de estas proteínas sobre los organismos inoculados con el veneno, caso de mamíferos (Leipold et al., 2012).

Generalidades de las β -neurotoxinas del género Centruroides

Las β -neurotoxinas del género Centruroides (β -NTxC) son péptidos de entre 60-70 aa que conservan el característico arreglo tridimensional de las NTx-Nav's de alacrán así como la presencia de una modificación postraduccional (amidación del C-terminal), la cual es clave para la afinidad de estos péptidos. Estas β -toxinas se unen al sitio 4 de los Nav's a través de su interacción con los segmentos conectores de las regiones transmembrana del subdominio sensor de voltaje II (sDSV-II) y el subdominio formador del poro III (sDFP-III). La unión de estas toxinas produce los clásicos efectos β -tóxicos como lo son la reducción del pico de corriente máxima y el corrimiento del potencial de activación a valores más negativos. Este último efecto, tóxico a nivel fisiológico, es atribuido a un mecanismo, descrito por Cestèle y colaboradores en 1998, conocido como el atrapamiento del sensor de voltaje (aS4) (Cestèle et al., 1998). Esta hipótesis sugiere que las β -neurotoxinas interactúan directamente sobre el sensor de voltaje (S4) del sitio 4 de los Nav's, manteniéndolo en una conformación despolarizada posteriormente a su inactivación. En consecuencia esta configuración, exhibida por parte del S4, permite disminuir la energía de activación del canal, promoviendo la apertura del canal a potenciales más negativos. A pesar que las β -neurotoxinas tienen la capacidad de interactuar con varias isoformas de los Nav's, la mayoría de estos péptidos, descritos en la literatura, no presentan actividad sobre canales relacionados a la nocicepción (dolor), como lo son los Nav1.7, 1.8 y 1.9 (Schiavon et al., 2012)(Bennett et al., 2019).

Obtención recombinante de β -neurotoxinas de alacrán del género *Centruroides*

La expresión heteróloga es una técnica que nos permite la producción de una proteína utilizando un organismo diferente al original del producto de interés. Esta metodología ha permitido la obtención de moléculas de importancia médica, como es el caso de las toxinas recombinantes de alacrán (rScTx). A pesar del limitado número de reportes de rScTx, se ha demostrado la viabilidad de utilizar sistemas de expresión recombinante para la obtención de β -neurotoxinas con actividad biológica. Siendo la expresión heteróloga una alternativa para la obtención de estos péptidos de importancia médica como es el caso de las β -toxinas de los géneros *Tityus*, *Leirus*, *Buthus* y *Centruroides* (Cohen et al., 2005; Dai et al., 2012; Shenkarev et al., 2019; Turkov et al., 1997). El péptido CsslI es una β -neurotoxina, extraída del veneno del alacrán *Centruroides suffusus suffusus*, el cual, exhibe un arreglo tridimensional clásico perteneciente a esta familia de proteínas (Saucedo et al., 2012). Este péptido es de relevancia médica debido a que es la molécula más abundante y tóxica del veneno, con una LD50 de 0.7 μ g /20 g de ratón (Canul-Tec et al., 2011). Esta toxicidad está dada por la capacidad de esta β -toxina de interactuar con el Nav1.6, exhibiendo el efecto de modificar la cinética del canal mediante la reducción del pico de corriente máxima y el desplazamiento del potencial de activación a valores más negativos. En el 2007, Estrada y colaboradores, produjeron el péptido CsslI mediante expresión heteróloga (rCsslI), sin embargo, esta toxina recombinante exhibió una disminución en su actividad en una razón de 15 veces con respecto a la proteína nativa de CsslI (nCsslI) (Hernández-Salgado et al., 2009). La rCsslI, al ser un producto de expresión en *E. coli*, no exhibió la característica amidación del C-terminal presentada por la mayoría de los péptidos de efecto β del género *Centruroides*. Siendo esta falta de amidación, la única diferencia vinculada con la pérdida de actividad por parte de rCsslI en relación a nCsslI. Debido a esto, Estrada y colaboradores en el 2011 estudiaron el efecto de agregar cargas positivas en el C-terminal de la toxina rCsslI, obteniendo como producto final a la variante HisrCsslI-T64R/N66R (HisrCsslI-RCR). Esta variante peptídica, HisrCsslI-RCR, recuperó la afinidad perdida por la rCsslI, presentando una unión similar al de la toxina nativa con el canal Nav1.6 (Estrada et al., 2011). Este resultado permitió resaltar la importancia de la amidación, así como las implicaciones de la carga en el C-terminal para el apropiado funcionamiento de estas proteínas con sus blancos moleculares. Al ser la toxina HisrCsslI-RCR un péptido de fácil plegamiento, esto lo convierte en un apropiado modelo de estudio para analizar el efecto de realizar mutaciones en la secuencia de esta toxina. Esto último con el fin de evaluar el efecto de modificar la secuencia de esta toxina en el reconocimiento de otros canales diferentes al blanco natural de esta toxina.

β -NTxC con actividad sobre Nav's relacionados a la nocicepción.

Actualmente el número de reportes de β -NTxC con la capacidad de modular canales relacionados a la nocicepción es prácticamente nulo, siendo el único reporte existente en la literatura descrito por Vandendriessche y colaboradores en el 2010 (Vandendriessche et al., 2010). En este estudio se purificó del veneno del alacrán *Centruroides elegans* a la toxina Cell8, observando que este péptido presentó los clásicos efectos β -neurotóxicos sobre la isoforma de importancia médica en el dolor el Nav1.7. Este péptido presenta características contrastantes a nivel de secuencia primaria en comparación con las toxinas convencionales de alacrán del género *Centruroides*, observando diferentes mutaciones, deleciones e inserciones a lo largo de la secuencia de Cell8.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Se presenta un esquema de la construcción del plásmido pQE30 con las variantes peptídicas de la toxina rCsslI-RCR (SEQ. ID NO: 4), rCsslI-TCD (SEQ. ID NO: 5) y rCsslI-Del-D23A-TCD (SEQ. ID NO: 6). El promotor PT5 es inducible por IPTG y la región marcada como 6His incluye una metionina inicial y 11 aminoácidos más, 6 de los cuales son histidinas. Después del sitio de restricción *Bam*HI, que codifican a los aminoácidos Glicina (G) y Serina (S) respectivamente, se encuentra la región codificante de los aminoácidos IEGR que reconoce la proteasa FXa seguidos del primer aminoácido de la toxina. Antes del sitio *Pst*I (que codifican a los aminoácidos Leucina (L) y Glutamina (Q) respectivamente, hay dos codones de paro precedidos por el último aminoácido de la toxina.

Figura 2. Se muestra una imagen del análisis mediante SDS-PAGE de las proteínas recombinantes HisrCsslI-RCR (SEQ. ID NO: 1), HisrCsslI-TCD (SEQ. ID NO: 2) y HisrCsslI-Del-D23A-TCD (SEQ. ID NO: 3) producidas en células de la cepa *Shuffle* y purificadas por cromatografía de afinidad con Ni-NTA agarose en condiciones desnaturalizantes. MM: marcador molecular, FS: fracción soluble, R: Recirculado, TX: Lavado con Tris-HCl, L-X: Lavado con 40mM de Imidazol, E-X: Elusiones con 400mM de Imidazol.

Figura 3. Se presenta un cromatograma resultado de la purificación por fase reversa de la proteína reducida después del tratamiento con DTT y la proteína plegada in vitro para las variantes HisrCsslI-RCR (SEQ. ID NO: 1), HisrCsslI-TCD (SEQ. ID NO: 2) y HisrCsslI-Del-D23A-TCD (SEQ. ID NO: 3).

Figura 4. Se presenta una gráfica de ensayos electrofisiológicos de las variantes peptídicas de HisrCsslI-RCR (SEQ. ID NO: 1), HisrCsslI-TCD (SEQ. ID NO: 2) y HisrCsslI-Del-D23A-TCD (SEQ. ID NO: 3) sobre los canales hNav1.6 y hNav1.7.

Figura 5. Se presenta una gráfica de ensayo de mecanocicepción de variantes peptídicas de HisrCsslI-TCD (SEQ. ID NO: 2) y HisrCsslI-Del-D23A-TCD (SEQ. ID NO: 3).

Figura 6. Se presenta una gráfica de ensayo de mecanocicepción en un modelo de dolor inflamatorio de variante peptídica HisrCssl-Del-D23A-TCD (SEQ. ID NO: 3).

Figura 7. Se presenta una gráfica de ensayo de mecanocicepción en un modelo de dolor neuropático de la variante peptídica de HisrCssl-Del-D23A-TCD (SEQ. ID NO: 3).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

El término antinociceptivo es usado en la presente invención para referirse a la alteración de los aspectos sensoriales relacionados a la intensidad del dolor.

El término variante de péptido recombinante es usado en la presente invención para referirse a las variante peptídicas de las neurotoxinas denominadas: HisrCssl-RCR (SEQ. ID NO: 1), HisrCssl-TCD (SEQ. ID NO: 2) y HisrCssl-Del-D23A-TCD (SEQ. ID NO: 3), que tienen un efecto sobre el canal de sodio hNav1.7 y presentan actividad antinociceptiva (analgésica) en modelo murino.

Las expresiones "**célula**" y "**cultivo de células**" según se emplean aquí se usan como sinónimos y todas estas designaciones incluyen su progenie. Por tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas " incluyen la célula sujeto primario y cultivos derivados de ella sin considerar el número de transferencias. También se entiende que no toda progenie debe ser precisamente idéntica en su contenido de ADN debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica como la detectada en la célula originalmente transformada. Cuando se intentan designaciones distintas, deben ser claras a partir del contexto.

El término "**cantidad efectiva**" o "**cantidad farmacológicamente efectiva**" de un compuesto en dosis unitaria de la mezcla depende de varios factores. Entre estos factores se incluyen cantidades de los otros ingredientes en caso de emplearse, y tolerancia del ingrediente activo del compuesto. La cantidad efectiva del ingrediente activo varía desde alrededor de 0.1% hasta casi 50% por peso, con base en el peso total del compuesto.

"**Vehículo farmacéuticamente aceptable**" significa los excipientes sólidos o líquidos de relleno, diluyente o sustancia que pueden usarse con seguridad en administración sistémica o tópica. Según la vía particular de administración son farmacéuticamente aceptables varios vehículos bien conocidos en la industria e incluyen sólidos o líquidos de relleno, diluyentes, hidrótrofos, agentes tensoactivos y sustancias encapsulantes. La cantidad de vehículo empleada junto con el péptido analgésico suministra una cantidad manejable de material por dosis unitaria del compuesto.

Vehículos farmacéuticamente aceptables para administración sistémica que pueden incorporarse en la composición de la invención incluyen azúcar, féculas, celulosa, aceites vegetales, amortiguadores, polioles y ácido algínico. Vehículos específicos

farmacéuticamente aceptables se describen en los siguientes documentos, todos mencionados aquí como referencia: U.S. 4,401,663, Buckwalter et al., emitido en agosto 30, 1983; European Patent Application No. 089710, LaHann et al., publicado Sept. 28, 1983; y European Patent Application No. 0068592, Buckwalter et al., publicado enero. 5, 1983. Los vehículos preferidos para administración parenteral incluyen solución salina, propilenglicol, pirrolidona, oleato etilo, etanol acuoso y combinaciones de estos.

Vehículos representativos incluyen acacia, agar, alginatos, hidroxialquilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, carragenina, celulosa en polvo, goma guar, colesterol, gelatina, goma agar, goma arábica, goma karaya, goma ghatti, goma de frijol locust, octoxinol 9, alcohol oleil, pectina, ácido poliacrílico y sus homólogos, polietilenglicol, alcohol polivinílico, poliacrilamida, lauril sulfato sódico, óxido polietilénico, polivinilpirrolidona, glicol monoestearato, propilenglicol monoestearato, goma xantana, tragacanto, ésteres sorbitan, alcohol esteárico, fécula y sus modificaciones. Los rangos adecuados varían desde 0.5% a 1%.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Análisis estructural para obtener toxinas analgésicas.

Estudios de dinámica molecular, realizados por los inventores de la presente invención, permitieron dilucidar la unión atómica a detalle, de las toxinas β -NTxC nCsslI y rCsslI-RCR sobre el canal hNav1.6. Dichos estudios revelaron la importancia de la distribución de carga en el C-terminal, cargada positivamente, así como la región, localizada en la primer asa conectora, del N-terminal como región importante para la interacción por parte de estas toxinas con su blanco molecular (Montero-Dominguez & Corzo, 2023). El análisis de la distribución de carga por parte de la toxina Cell8 (datos aún no publicados) mostró una distribución de carga negativa en el C-terminal, esto último contrastante con las β -NTxC. Por otro lado, la toxina Cell8 presenta una deleción en secuencia de la región del N-terminal, respecto a la toxina rCsslI-RCR, la cual llevó a plantear que podría estar involucrada en la interacción por parte de esta toxina con el canal relacionado al dolor el hNav1.7.

Debido al relevante papel, evidenciado por nuestros estudios in silico, de las regiones N- y C-terminal en la interacción péptido/canal, en la presente invención se mimetizaron las propiedades eléctricas del carboxilo terminal, así como la deleción-mutación localizada en el N-terminal de la toxina Cell8 sobre la HisrCsslI-RCR (SEQ. ID NO: 1). Esto con el fin de obtener variantes peptídicas con la habilidad de modular el canal hNav1.7 y con ello generar un péptido con actividad antinociceptiva (analgésica).

En la presente invención la secuencia de la toxina recombinante HisrCsslI-RCR (SEQ. ID NO: 1) se insertó en el plásmido de interés pQE30, para ver su expresión detallada ver el **ejemplo**

1. Este plásmido con el inserto de interés fue utilizado en la presente invención para transformar una cepa microbiana, a manera de ejemplo se utilizó la bacteria *E. coli Shuffle* (ver **ejemplo 2**), se hicieron cultivos en matraces de 1 L, de los cuales se obtuvo la toxina CsslII fusionada a 16 aminoácidos en el amino terminal. En la presente invención la expresión de las variantes de la toxina recombinante HisrCsslII-RCR (SEQ. ID NO: 1) se realizó en bacterias de *E. coli*, pero en la actualidad se pueden utilizar una gran variedad de células huésped como sistemas celulares de expresión de toxinas, entre los que destacan bacterias, levaduras, células de insectos y células de mamíferos. En la presente invención se determinó que de los aminoácidos fusionados a la toxina rCsslII, uno es el inicio de la traducción de la proteína (M), tres son enlace al sitio "tag" de Histidinas (R,G y S), seis son el sitio "tag" de histidinas (6H), dos pertenecen a los aminoácidos propios de los codones de restricción para introducir el sitio proteolítico (GS), y cuatro pertenecen a los aminoácidos propios de los codones de corte para el FXa (IEGR). Por lo tanto, el gen codificó entonces para una variante de toxina recombinante, por ejemplo la denominada en la presente invención como HisrCsslII-RCR (SEQ. ID NO: 1) (ver **ejemplo 3**), que resultó tener una menor toxicidad que la toxina nativa: nCsslII, presentado una secuencia primaria similar a nCsslII, pero con una secuencia de fusión en el N-terminal que incluye seis histidinas y una región codificante (EIRG) para eliminarla si es que causa deficiencias en su plegamiento y actividad biológica. También, el péptido HisrCsslII-RCR (SEQ. ID NO: 1) no contiene una amidación en el último aminoácido (C-terminal), en lugar de éste presenta un grupo carboxilo (COOH). Utilizando la información obtenida de nuestros modelos computacionales de interacción (datos no mostrados), así como la información amino peptídica de una toxina del género *Centruroides* denominada Cell8, los inventores de la presente invención diseñaron dos variantes peptídicas de la toxina HisrCsslII-RCR (SEQ. ID NO: 1), con diferentes características eléctricas y espaciales, con la finalidad de obtener un péptido que interactuara con el canal hNav1.7 y que presentara efecto analgésico. Empleando técnicas de mutagénesis sitio-dirigida, en la presente invención se produjeron estas dos variantes peptídicas, las cuales no presentaron actividad tóxica en ratones (modelo murino), exhibiendo la actividad esperada en el canal blanco y el efecto antinociceptivo en el modelo murino. Estas variantes obtenidas en la presente invención no presentaron actividad tóxica, debido a que la modificación en el C-terminal de cada péptido permitió eliminar el efecto de abrir los potenciales de activación a valores más negativos, con respecto al blanco natural de la toxina el canal hNav1.6. Los resultados de la presente invención demostraron que la modificación del C-terminal previene la toxicidad del péptido HisrCsslII-TCD (SEQ. ID NO: 2). Por otro lado el cambio del N-terminal permitió el reconocimiento de la variante con el canal objetivo el hNav1.7 reduciendo el pico de corriente máxima y produciendo un efecto antinociceptivo (analgésico) a nivel sistémico (ver **ejemplo 8**).

Para producir las toxinas mutantes HisrCsslI-TCD (SEQ. ID NO: 2) y HisrCsslI-Del-D23A-TCD (SEQ. ID NO: 3), en la presente invención se procedió de la misma forma que para el caso de la toxina HisrCsslI-RCR (SEQ. ID NO: 1) (ver **ejemplos 1 y 2**) es decir se clonó en el vector de expresión pQE-30. Una vez verificada la clonación en fase en el vector de expresión y transformada la cepa microbiana, en este caso *E. coli Shuffle*, se hicieron cultivos en matraces de 1 L de los cuales se obtuvo las toxinas fusionadas con 16 aminoácidos en el amino terminal. Los aminoácidos fusionados a las toxinas HisrCsslI-TCD (SEQ. ID NO: 2) y HisrCsslI-Del-D23A-TCD (SEQ. ID NO: 3), corresponden uno al inicio de la traducción de la proteína (M), tres son enlace al sitio "tag" de Histidinas (A, G y S), seis son el sitio "tag" de histidinas (6H), dos pertenecen a los aminoácidos propios de los codones de restricción para introducir el sitio proteolítico (GS), y cuatro pertenecen a los aminoácidos propios de los codones de corte para el FXa (IEGR). Por lo tanto el gen codificó entonces para toxinas recombinantes denominada en la presente invención como HisrCsslI-TCD (SEQ. ID NO: 2) y HisrCsslI-Del-D23A-TCD (SEQ. ID NO: 3) sin amidación en el último aminoácido, en lugar de esto presenta un grupo carboxilo (Asp-COOH).

En todos los casos, en la presente invención los cultivos de la bacteria recombinante productora fueron realizados a diferentes temperaturas propias para mesófilos, entre 20 y 38 °C, induciendo con IPTG al alcanzar una densidad óptica (DO) a 600 nm de 0.5 de absorbancia (ver **ejemplo 3**). No se observaron diferencias en la solubilidad de la proteína producida a temperaturas de inducción menores a 37°C. En la presente invención se cosecharon las células de *E. coli* cuando se observó un crecimiento apropiado. Se verificó la sobreexpresión de la proteína recombinante por geles SDS-PAGE con las células completas (ver **ejemplo 4**). La integridad de las proteínas de fusión y la ausencia de multímeros unidos por enlaces covalentes fueron verificadas por espectrometría de masas (ver **ejemplo 5**). Por los valores de masas los inventores de la presente invención dedujeron que no se trató de multímeros unidos por enlaces covalentes (por ejemplo: puentes disulfuro intramoleculares). Es importante señalar que al modificar las condiciones de expresión, bajando la temperatura de incubación, disminuyendo la velocidad de agitación o la densidad celular del cultivo para la inducción, los inventores de la presente invención no evitaron que la mayor parte de la proteína recombinante se obtuviera en forma de cuerpos de inclusión.

Para la purificación de los cuerpos de inclusión en la presente invención se rompieron las células bacterianas y se lavó la fracción insoluble, a un pH apropiado (entre 7-9). Para disolver los cuerpos de inclusión se utilizó una solución desnaturalizante o de extracción. Las proteínas de fusión se purifican haciendo pasar la solución desnaturalizante o de extracción por una columna de metal (afinidad con Níquel). Posteriormente fue lavada a un pH apropiado. El efluente fue colectado y desalado por cromatografía en fase reversa (rpHPLC). Además de tener el mismo valor de masa en estado oxidado, el péptido denominado en la

presente invención HisrCsslI-TCD (SEQ. ID NO: 2), y HisrCsslI-Del-D23A-TCD (SEQ. ID NO: 3), presenta varios patrones de puentes disulfuro, este péptido se obtiene cuando las múltiples fracciones señaladas en el cromatograma anterior se reducen con ditionitroto (DTT). Después de reducir la proteína, se observa en la repurificación por rpHPLC, una fracción homogénea de masa molecular de 9,401.60 Da y 90.72.29 Da respectivamente. Este valor correspondió al valor teórico para el péptido reducido (ver **ejemplo 4**, para mayores detalles).

La toxina recombinante HisrCsslI-TCD (SEQ. ID NO: 2) descrita en la presente invención es químicamente diferente a la toxina HisrCsslI-RCR (SEQ. ID NO: 1), en el sentido que esta tiene los aminoácidos T y D en el extremo C-terminal del péptido.

La toxina recombinante HisrCsslI-Del-D23A-TCD (SEQ. ID NO: 3) descrita en la presente invención es químicamente diferente a la toxina nativa HisrCsslI-RCR (SEQ. ID NO: 1), en el sentido que esta tiene los aminoácidos T y D en el extremo C terminal, así como la delección de la secuencia LGD presente en el N-terminal y una mutación en el residuo D21 por A en el péptido.

Plegamiento in vitro

Los plegamientos obtenidos por los inventores de la presente invención fueron realizados con Glutati6n oxidado- reducido en una concentraci6n que permiti6 determinar el plegamiento in vitro, a partir de la masa de los puentes disulfuro oxidados, las cuales fueron 9,394.6 Da para la variante HisrCsslI-TCD (SEQ. ID NO: 2) y 9,064.9 Da para HisrCsslI-Del-D23A-TCD (SEQ. ID NO: 3) (ver detalles en el **ejemplo 5**).

Tal como se buscaba en la presente invenci6n las variantes peptídicas recombinantes no presentaron actividad t6xica, a una concentraci6n 4 veces superior a la DL50 de la toxina HisrCsslI-RCR (SEQ. ID NO: 1) (ver **ejemplo 6**). Siendo únicamente la variante HisrCsslI-Del-D23A-TCD (SEQ. ID NO: 3) aquella que present6 la capacidad de modificar la apertura del canal objetivo el hNav1.7 (ver **ejemplo 7**).

Ensayos de nocicepci6n

Particularmente las variantes de péptidos recombinantes de la presente invenci6n exhibieron actividad antinociceptiva, siendo la variante HisrCsslI-Del-D23A-TCD (SEQ. ID NO: 3) la que present6 un efecto equiparable a un control positivo de analgesia (DAMGO). Esta misma

variante exhibió un efecto analgésico en dos modelos de dolor, siendo estos últimos modelos de dolor neuropático e inflamatorio. La invención también se refiere a las composiciones farmacéuticas que comprenden dichos péptidos. Esta composición corresponde al péptido analgésico disuelto en una solución salina al 0.9 % previa a su administración, siendo un requerimiento para su almacenamiento esta misma solución ligeramente acidificada para mantener el correcto estado de la proteína.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos son dados para ilustrar algunos de los modos para obtener o utilizar la presente invención. Es posible llevar a cabo muchas variaciones de estos sin salirse del alcance de la presente invención y por lo tanto de ninguna manera debería considerarse que la limitan de alguna forma los alcances de la presente invención.

Ejemplo 1. Obtención de las variantes peptídicas HisrCsslI-RCR (SEQ. ID NO: 1), HisrCsslI-TCD (SEQ. ID NO: 2) y HisrCsslI-Del-D23A-TCD (SEQ. ID NO: 3).

En la presente invención se utilizó el plásmido pQE30 con la secuencia codificante del péptido HisrCsslI-RCR (SEQ. ID NO: 1), como plantilla para diseñar oligonucleótidos para generar las variantes peptídicas de interés utilizando la técnica PCR-Mutagenic-Quick-Change. La figura 1 representa la construcción y el inserto en dicho plásmido. El procedimiento de mutagénesis fue guiado primeramente por la creación de una variante intermedia la variante HisrCsslI-TCR (SEQ. ID NO: 7) mediante los oligos (Secuencias 5' a 3') Fw R64T (SEQ. ID NO: 8) y Rv R64T (SEQ. ID NO: 9). Posteriormente creada dicha variante peptídica se diseñó otro par de oligos para la obtención de la variante HisrCsslI-TCD (SEQ. ID NO: 2) mediante los oligos Fw R66D (SEQ. ID NO: 10) y RVR66D (SEQ. ID NO: 11).

Finalmente se utilizó un par de oligos para generar las modificaciones en el extremo N-terminal, los cuales fueron el Fw Del_A (SEQ. ID NO: 12) y el RV Del_A (SEQ. ID NO: 13). Como fueron mutaciones sobre la construcción pQE30-HisrCsslI-RCR, todas las variantes presentaron 6 colas de histidinas y la región que codifica para el sitio de reconocimiento del FXa (IEGR). Cada par de oligos presentó diferentes temperaturas de apareamiento para la realización de la PCR-mutagénica, siendo las temperaturas de solapamiento y de no solapamiento para cada variante las siguientes: 1) HisrCsslI-TCR (SEQ. ID NO: 7) de 64 °C y 54.6 °C, HisrCsslI-TCD (SEQ. ID NO: 2) de 59.8 °C y 50.8 °C y HisrCsslI-Del-D23A-TCD (SEQ. ID NO: 3) de 67.3 y 60°C, respectivamente. Para todas las construcciones se mantuvieron las secuencias que reconocen a las enzimas de restricción BamHI y PstI y dos codones de paro en el extremo 3'. Se corroboró el correcto proceso de mutagénesis mediante la secuenciación de cada construcción utilizando oligos Fw-pQE30. En la lista de secuencias se muestran la secuencia de aminoácidos y nucleótidos.

Ejemplo 2. Purificación de ADN plasmídico y transformación de *E. coli*.

En la presente invención el ADN plasmídico de *E. coli* se extrajo a partir de cultivos de 5 ml, incubados durante toda la noche a 37°C y 250 rpm, en medio LB adicionando ampicilina. Las células se colectaron por centrifugando por 1 min, a 14,000 rpm y se suspendieron en 1 mL de solución SET (sacarosa 20%, 50 mM de Tris-HCl pH 7.6 y 50 mM de EDTA) para lavar. Se centrifugaron y suspendieron en 150 µL de la misma solución. Posteriormente se adicionaron 10 µL de ARNsa (10 mg/mL), agitando y 350 µL de SDS (2%)/NaOH (0.4 M) en relación volumétrica 50:50, se mezcló por inversión e incubó en un baño de hielo por 10 minutos. Se agregaron 250 µL de 3 M de acetato de sodio pH 4.8 y se mezcló antes de incubarlo en hielo por 30 minutos. Se centrifugó 10 minutos y el sobrenadante (SN) se transfirió a un tubo estéril, para precipitar se agregó un volumen de isopropanol, se mezcló por inversión y se centrifugó por 5 minutos a 14,000 rpm. La pastilla se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 30 µL de agua. Finalmente el ADN plasmídico de *E. coli* para secuenciación se extrajo con el Plasmid Mini Kit (QIAGEN), siguiendo las indicaciones del proveedor.

En la presente invención la cepa *E. coli* Shuffle fue transformada por choque térmico, pasando una suspensión de células de 4 °C a 42 °C en un baño maría durante 25 s. Se utilizaron entre 10 y 50 ng de plásmido para inocular 100 µL de células electrocompetentes. Después del choque térmico, cada alícuota transformada se transfirió a 1 mL de medio SOC y se incubaron por 1 h a 37 °C y 250 rpm para su recuperación. Posteriormente se plaquearon 100 µl en cajas de LB con 200 µg/mL de ampicilina.

Ejemplo 3. Expresión recombinante, obtención de fracciones puras.

En la presente invención la cepa *E. coli* Shuffle fue utilizada como huésped, para la expresión de las variantes de los péptidos recombinantes descritos en la presente invención. Se seleccionaron colonias de células aisladas, para iniciar pre-inóculos y realizar la expresión de cada variante. Cada variante se creció a 37 °C y 250 rpm en medio LB adicionado con 200 mg/mL de ampicilina durante 12 horas.

Se iniciaron cultivos de 1L de medio LB a 37 °C y 250 rpm de la cepa *shuffle* transformada con el plásmido de expresión. Previamente, se adiciona ampicilina al medio de cultivo para obtener una concentración final de 200 mg/mL. Después de crecer hasta una DO entre 0.4-0.6, medida a 550 nm, se indujo la expresión con IPTG a concentración final de 1 mM por un periodo de 6 a 8 h manteniendo los cultivos de 21 a 37 °C en experimentos independientes para evaluar la solubilidad del péptido sobreexpresada. Posteriormente se centrifugó a 5,000 x g durante 20 min a 4 °C en tubos para centrífuga de 250 mL. Se lavó con 200 mL de una solución de Tris 50 mM, pH 8 y se centrifugó nuevamente a 5,000 x g por 20 min a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 25 mL de la misma solución. Las células se rompieron utilizando una prensa de French. Se obtuvieron aprox. 20 mL de

extracto concentrado. El extracto se centrifugó a 5,000 x g por 10 min desechando el sobrenadante, ya que en todas las condiciones de expresión probadas, la péptido se encontró en la fracción insoluble. El precipitado se lavó tres veces con 20 mL de Tris 20 mM, pH 8 y posteriormente se trató con 15 mL de una solución desnaturante de Tris 50 mM, 6 M de cloruro de guanidina a pH 8 para extraer la péptido. Posteriormente se centrifugó a 2,000 x g a 4 °C durante 1 hora. Este extracto se utilizó para la purificación por afinidad.

Ejemplo 4. Purificación de las variantes de péptidos y confirmación de los productos

En la presente invención los péptidos de fusión expresados se purificaron por afinidad con la resina Ni-NTA agarose (QIAGEN), en condiciones desnaturizantes y siguiendo las recomendaciones del proveedor. El protocolo seguido una vez obtenido el extracto en cloruro de guanidina 6 M fue: Poner en contacto dicho extracto con Ni-NTA agarose equilibrada con la solución de extracción por 4 h a 4 °C, con agitación constante. Se centrifugó a 1,000 x g, durante 1 min., para recuperar la resina y realizar 3 lavados de la misma con la solución de extracción o hasta observar la desaparición de espuma (otras proteínas). Una vez lavada, se empacó la resina en una columna adecuada al volumen usado (para 1-2 mL de resina, se usó una jeringa de 3 o 5 mL) y se eluyó con Tris 50 mM, cloruro de guanidina 6 M a pH 8 adicionando 400 mM de imidazol. Se colectaron de 5 a 7 fracciones de 1 mL cada una. Posteriormente se realizó la repurificación por rpHPLC, usando como solvente A 0.1% TFA en H₂O y solvente B 0.1% TFA en acetonitrilo. Los péptidos obtenidos fueron separados en una columna C18 (25mm x 4.1mm) con un gradiente de 20 a 60% de solvente B en un lapso de 40 min (1%/min). Para la repurificación de los péptidos, después del plegamiento in vitro y la proteólisis, se usaron las mismas condiciones de rpHPLC. Los péptidos fueron separados por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), de acuerdo con el método de Laemmli (Laemmli, 1970). Se utilizó una cámara Mighty small II, con geles de 1 mm de espesor. Un gel concentrador al 4 % precede al gel de separación al 12% o al 15%. Las muestras a analizar se incubaron durante 5 min a 95 °C, en presencia de una solución de desnaturización, que contiene Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, SDS 4 %, glicerol 20 %, beta-mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol 0.05 % (v/v). La migración se efectuó a corriente constante entre 30 y 50 mA. Después de la migración el gel siguió el tratamiento de tinción. El gel se incubó en una solución de ácido acético (10% v/v), metanol (30% v/v) y azul de Coomassie (0.2% v/v). Posteriormente se realizaron lavados del gel en una solución de ácido acético (10% v/v), metanol (30% v/v) para quitar el exceso de colorante (**Figura 2**).

Ejemplo 5. Plegamiento in vitro y espectrometría de masas

En la presente invención las reacciones de plegamiento se realizaron en un volumen de 15 mL, con 1 mg de péptido de fusión, que se redujo con 50 mM DTT y se purificó por rpHPLC previamente. Las condiciones de plegamiento fueron las siguientes: Tris 0.2 M, cloruro de

guanidina 2 M, pH 8 con GSH:GSSG 1 mM:0.1mM a 4°C durante 24 h. Posteriormente, la variante del péptido plegada se purificó por rpHPLC, para eliminar los reactivos y sales del ensayo de reacción (**Figura 3**). Las masas moleculares de los péptidos obtenidos fueron determinadas por MALDI-TOF o ESI-ION-TRAP (Romeo et al., 2008).

Ejemplo 6. Ensayos de toxicidad in vivo

En la presente invención la toxicidad se evaluó mediante una inyección intracraneal, que se llevó a cabo en grupos de 5 ratones CD1 machos de 20 g de peso en promedio, inyectando 3.6 mg por ratón de cada variante de péptido, usando la toxina nativa correspondiente a 4LD50, como control positivo. Se observaron los efectos directamente hasta 3 horas después de la inyección e intermitentemente hasta 24 h después.

Ejemplo 7. Ensayos de electrofisiología

Los ensayos electrofisiológicos se realizaron en células de Ovario de Hámster Chino (CHO), que expresan de manera estable el hNav1.7 y células de riñón de embrión humano (HEK) HEK293, que expresan de manera estable el hNav1.6. Los ensayos electrofisiológicos se realizaron utilizando la técnica de Patch-clamp en la configuración célula completa. Todos los ensayos se realizaron a una concentración final de 5 μ M, para cada una de las variantes a temperatura ambiente. Se realizaron los registros con cambios de voltaje hasta pasar de -70 a +50 mV en incrementos de 10 mV y posteriormente se realizaron curvas I/V para analizar el efecto de cada variante (**Figura 4**).

Ejemplo 8. Ensayos de nocicepción

En la presente invención los ensayos de nocicepción fueron realizados con ratones CD-1 siguiendo los protocolos del comité de bioética del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM). Se evaluó una dosis efectiva de 300 ng de cada péptido recombinante vía intratecal, utilizando DAMGO como control positivo y solución salina como control negativo (**Figura 5**). El vehículo de administración para cada dosis efectiva fue solución salina al 0.9 % de NaCl. Cada ratón fue anestesiado previo a la administración intratecal de cada fármaco, recibiendo un volumen total de 10 μ L. Una vez recuperados de la anestesia, se midió la respuesta al retiro de la pata posterior a la aplicación de un estímulo cada 15, 30, 60 y 120 min. Se midió la latencia de retiro antes de la administración de cada fármaco para determinar el umbral nociceptivo (**Figura 5**). Se utilizó PBS como control negativos y 5 μ g de péptido DAMGO como control positivo de analgesia. Se utilizó una ANOVA de 2 vías para analizar diferencias significativas.

Ejemplo 9. Ensayos de nocicepción en modelos de dolor inflamatorio y neuropático.

En la presente invención los ensayos de nocicepción en modelos de dolor inflamatorio y neuropático fueron realizados con ratones CD-1 siguiendo los protocolos del comité de bioética del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM). Se evaluó una dosis efectiva de 300 ng de cada péptido recombinante vía intratecal, utilizando DAMGO como control positivo y solución salina como control negativo. El vehículo de administración para cada dosis efectiva fue solución salina al 0.9 % de NaCl. Cada sujeto de estudio fue inducido según el modelo de dolor a evaluar. Para el caso del modelo inflamatorio se realizó una inyección intraplantar de Coadyuvante completo de Freud (ACF; 1:1 en solución salina) en la pata derecha del ratón. Para el modelo de dolor neuropático, se generó una lesión generalizada del nervio ciático, produciendo cortes de la rama tibial y peronea del nervio en el bíceps femoris. Posterior a la sutura, se permitió la recuperación de los animales durante 14 días post inducción para la realización de las pruebas conductuales. Cada ratón anestesiado previo a la administración intratecal de cada fármaco, recibiendo un volumen total de 10 µL. Una vez recuperados de la anestesia, se midió la respuesta al retiro de la pata posterior a la aplicación de un estímulo cada 15, 30, 60 y 120 min. Se midió la latencia de retiro antes de la inducción y administración de cada fármaco para determinar el umbral nociceptivo (**Figura 6 y 7**). Se utilizó PBS como control negativos y 5 µg de péptido DAMGO como control positivo de analgesia. Se utilizó una ANOVA de 2 vías para analizar diferencias significativas.

REFERENCIAS

- Bennett, D. L., Clark, A. J., Huang, J., Waxman, S. G., & Dib-Hajj, S. D. (2019). The Role of Voltage-Gated Sodium Channels in Pain Signaling. *Physiological Reviews*, *99*(2), 1079–1151.
- Buschmann, H., Christoph, T., Friderichs, E., Maul, C., Sundermann, B. and Ed, J. L. (2002). Analgesics: from chemistry and pharmacology to clinical application.
- Canul-Tec, J. C., Riaño-Umbarila, L., Rudiño-Piñera, E., Becerril, B., Possani, L. D., & Torres-Larios, A. (2011). Structural basis of neutralization of the major toxic component from the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann by a human-derived single-chain antibody fragment. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(23), 20892–20900.
- Cestèle, S., Qu, Y., Rogers, J. C., Rochat, H., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1998). Voltage sensor-trapping: enhanced activation of sodium channels by beta-scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II. *Neuron*, *21*(4), 919–931.
- Cohen, L., Karbat, I., Gilles, N., Ilan, N., Benveniste, M., Gordon, D., & Gurevitz, M. (2005). Common features in the functional surface of scorpion beta-toxins and elements that confer specificity for insect and mammalian voltage-gated sodium channels. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(6), 5045–5053.

- Dai, H., Yin, S., Li, T., Cao, Z., Ji, Y., Wu, Y., & Li, W. (2012). Recombinant expression, purification, and characterization of scorpion toxin Bm α TX14. *Protein Expression and Purification*, 82(2), 325–331.
- de la Vega, R. C. R., & Possani, L. D. (2007). Novel paradigms on scorpion toxins that affects the activating mechanism of sodium channels. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 49(2), 171–180.
- Estrada, G., Restano-Cassulini, R., Ortiz, E., Possani, L. D., & Corzo, G. (2011). Addition of positive charges at the C-terminal peptide region of CsslI, a mammalian scorpion peptide toxin, improves its affinity for sodium channels Nav1.6. *Peptides*, 32(1), 75–79.
- García-Fajardo, L. E., Martínez-Linares, M. P. y González-Olaya, H. L., 2010. Inflamación y dolor: Cambios en el sistema nervioso periférico y central. *MedUNAB* 4.
- Hernández-Salgado, K., Estrada, G., Olvera, A., Coronas, F. I., Possani, L. D., & Corzo, G. (2009). Heterologous expressed toxic and non-toxic peptide variants of toxin CsslI are capable to produce neutralizing antibodies against the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*. *Immunology Letters*, 125(2), 93–99.
- Leipold, E., Borges, A., & Heinemann, S. H. (2012). Scorpion β -toxin interference with NaV channel voltage sensor gives rise to excitatory and depressant modes. *The Journal of General Physiology*, 139(4), 305–319.
- Livett, B. G., Sandall, D. W., Keays, D., Down, J., Gayler, K. R., Sat-kunanathan, N. y Khalil, Z., 2006. Therapeutic applications of cono-toxins that target the neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Tox-Icon* 48, 810-829.
- McGivern, J. G., 2007. Ziconotide: a review of its pharmacology and use in the treatment of pain. *Neurology. Dis. Treat.* 3, 69-85
- Montero-Dominguez, P. A., & Corzo, G. (2023). Characterization of the coupling mechanism of scorpion β -neurotoxins on the voltage-gated sodium channel hNav1.6. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 1–9.
- Saucedo, A. L., del Río-Portilla, F., Picco, C., Estrada, G., Prestipino, G., Possani, L. D., Delepiere, M., & Corzo, G. (2012). Solution structure of native and recombinant expressed toxin CsslI from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*, and their effects on Nav1.5 sodium channels. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1824(3), 478–487.
- Schiavon, E., Pedraza-Escalona, M., Gurrola, G. B., Olamendi-Portugal, T., Corzo, G., Wanke, E., & Possani, L. D. (2012). Negative-shift activation, current reduction and resurgent currents induced by β -toxins from *Centruroides* scorpions in sodium channels. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 59(2), 283–293.
- Schmalhofer, W. A., Calhoun, J., Burrows, R., Bailey, T., Kohler, M. G., Weinglass, A. B.,

- Kaczorowski, G. J., Garcia, M. L., Koltzenburg, M. y Priest, B. T., 2008. ProTx-II , a Selective Inhibitor of Na V 1 . 7 Sodium Channels , Blocks Action Potential Propagation in Nociceptors. *Mol. Pharmacol.* 74, 1476-1484.
- Shenkarev, Z. O., Shulepko, M. A., Peigneur, S., Myshkin, M. Y., Berkut, A. A., Vassilevski, A. A., Tytgat, J., Lyukmanova, E. N., & Kirpichnikov, M. P. (2019). Recombinant Production and Structure-Function Study of the Ts1 Toxin from the Brazilian Scorpion *Tityus serrulatus*. *Doklady. Biochemistry and Biophysics*, 484(1), 9–12.
- Turkov, M., Rashi, S., Noam, Z., Gordon, D., Ben Khalifa, R., Stankiewicz, M., Pelhate, M., & Gurevitz, M. (1997). In vitro folding and functional analysis of an anti-insect selective scorpion depressant neurotoxin produced in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 10(1), 123–131.
- Vandendriessche, T., Olamendi-Portugal, T., Zamudio, F. Z., Possani, L. D., & Tytgat, J. (2010). Isolation and characterization of two novel scorpion toxins: The alpha-toxin-like Cell8, specific for Na(v)1.7 channels and the classical anti-mammalian Cell9, specific for Na(v)1.4 channels. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 56(4), 613–623.
- Villarejo-Diaz, M., 2001. Farmacología de los agonistas y antagonistas de los receptores opioides. *Rev. Hosp. Met.* 1, 65-97.
- 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. y Bulaj, G., 2007. Structure/function characterization of micro-conotoxin KIIIA, an analgesic, nearly irreversible blocker of mammalian neuronal sodium channels. *J. Biol. Chem.* 282, 30699-30706

REIVINDICACIONES

1. Dos péptidos recombinantes caracterizados por tener una secuencia aminoacídica con una identidad de secuencia por encima del 50 % con las neurotoxinas del género Centruroides SEQ. ID NO: 2 y SEQ. ID NO: 3.
- 2.- De acuerdo a la reivindicación 2, estos péptidos recombinantes pueden estar solos (SEQ ID NO: 5 y SEQ. ID NO: 6) o con secuencias accesorias localizadas el N-terminal.
- 3 Dos péptidos recombinantes de acuerdo a la reivindicación 1 que presentan carga negativa en el extremo C-terminal.
- 4 De acuerdo a la reivindicación 3, el extremo C-terminal se define como el 20% de la secuencia al final del péptido recombinante.
5. Dos péptidos recombinantes de acuerdo a la reivindicación 3 donde la carga está dada por grupos funcionales orgánicos de carácter ácido.
6. Dos péptidos recombinantes de acuerdo a la reivindicación 5 cuyos grupos funcionales ácidos estén localizados en las cadenas laterales o en la cadena principal del péptido.
7. De acuerdo a la reivindicación 6 los portadores de los grupos funcionales pueden ser aminoácidos convencionales, no convencionales así como otro tipo de estructuras orgánicas que cumplan el propósito.
8. Dos péptidos recombinantes con la capacidad de no exhibir toxicidad a través de su administración en ratones comprendidos en la reivindicación 1, 2 y 3.
9. Un péptido recombinante con una delección-mutación en la secuencia del N-terminal y la presencia de una carga negativa según la reivindicación 7 (SEQ. ID NO: 3 y 6)
10. La secuencia peptídica en la reivindicación 9 está caracterizada por la delección de tres aminoácidos y una mutación localizada en la primera asa conectora de la estructura tridimensional del péptido.
11. De acuerdo a la reivindicación 10 la delección no se limita al tamaño mostrado en la reivindicación 12 siempre y cuando se encuentre en la primera asa conectara localizada entre la primer hoja beta y la alfa hélice de la toxina.
12. Un péptido recombinante (SEQ. ID NO: 3 y 6) de acuerdo a la reivindicación 1, 2 y 9 con la capacidad de generar únicamente el efecto de reducir el pico de corriente máxima sobre el canal hNav1.6 y hNav1.7.
13. De acuerdo a la reivindicación 12, este péptido recombinante modula principalmente a los canales hNav1.6 y hNav1.7 pero no se limita a otros

canales de sodio relacionados a la nocicepción como lo es el hNav1.3, hNav1.8 y Nav1.9

14. Un péptido recombinante (SEQ. ID NO: 3 y 6) con la capacidad de modificar la percepción del dolor mediante ensayos de nocicepción el cual está comprendido en la reivindicación 1, 2 y 13.

15. Un péptido recombinante (SEQ. ID NO: 3 y 6) de acuerdo con la reivindicación 1, 2 y 14 con la capacidad de reducir la percepción del dolor respecto a un control negativo que puede ser agua o cualquier otra sustancia que no altere la nocicepción del modelo de prueba de analgesia.

15. Un péptido recombinante (SEQ. ID NO: 3 y 6) de acuerdo con la reivindicación 1, 2 y 14 con la capacidad de reducir la percepción del dolor en un modelo de dolor inflamatorio, respecto a un control negativo que puede ser agua o cualquier otra sustancia que no altere la nocicepción del modelo de prueba de analgesia.

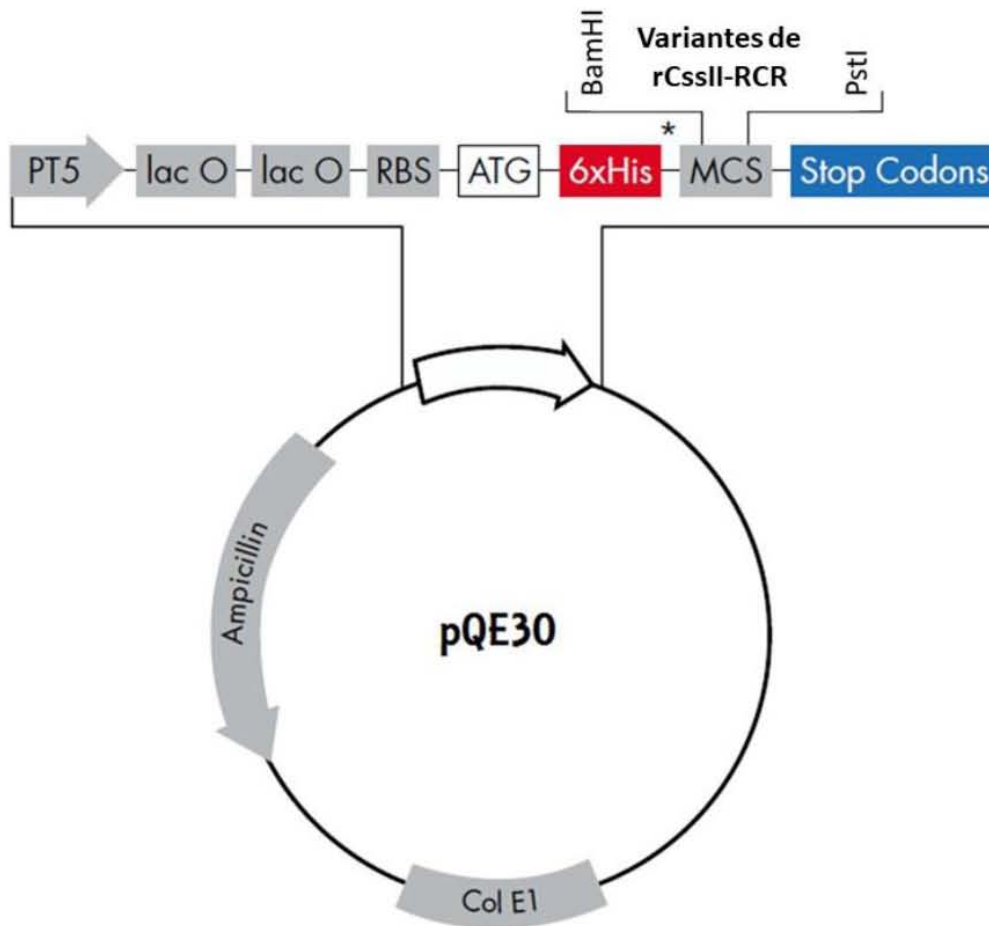
16. Un péptido recombinante (SEQ. ID NO: 3 y 6) de acuerdo con la reivindicación 1, 2 y 14 con la capacidad de reducir la percepción del dolor en un modelo de dolor neuropático, respecto a un control negativo que puede ser agua o cualquier otra sustancia que no altere la nocicepción del modelo de prueba de analgesia.

RESUMEN

La presente invención se refiere a la obtención de nuevas variantes de péptidos recombinantes, generados mediante expresión heteróloga en E. coli, con actividad antinociceptiva (analgésica), particularmente en mamíferos. Estas variantes peptídicas fueron concebidas en estudios de biología estructural computacional, realizados por los inventores de la presente invención, así como en la información de la secuencia de la toxina CeII8. Los péptidos recombinantes de la presente invención comprenden las variantes denominadas: HisrCssII-RCR (SEQ. ID NO: 1), HisrCssII-TCD (SEQ. ID NO: 2) y HisrCssII-Del-D23A-TCD (SEQ. ID NO: 3); que no presentaron toxicidad en el modelo murino. Las variantes de péptidos recombinantes de la presente invención exhibieron actividad antinociceptiva, siendo la variante HisrCssII-Del-D23A-TCD (SEQ. ID NO: 3) la que presentó un efecto equiparable a un control positivo de analgesia (DAMGO). Por otro lado, la variante HisrCssII-Del-D23A-TCD (SEQ. ID NO: 3) presentó efecto analgésico en modelos de dolor inflamatorio y neuropático. La invención también se refiere a las composiciones farmacéuticas que comprenden dichos péptidos.

NUEVAS VARIANTES DE PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD ANALGÉSICA PROVENIENTES DE NEUROTOXINAS OBTENIDAS MEDIANTE EXPRESIÓN HETERÓLOGA (Figuras)

1/7



n.º	Variante	MCS de cada variante
1	rCsslI-RCR	GSIEGRKEGYLVSKSTGCKYECLKLGDNNDYCLRECKQQYGKSSGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWPLPNK RCR -- LQ
3	rCsslI-TCD	GSIEGRKEGYLVSKSTGCKYECLKLGDNNDYCLRECKQQYGKSSGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWPLPNK TCD -- LQ
5	rCsslI-Del-D23A-TCD	GSIEGRKEGYLVSKSTGCKYECLK- -- NA YCLRECKQQYGKSSGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWPLPNK TCD -- LQ

FIGURA 1

2/7

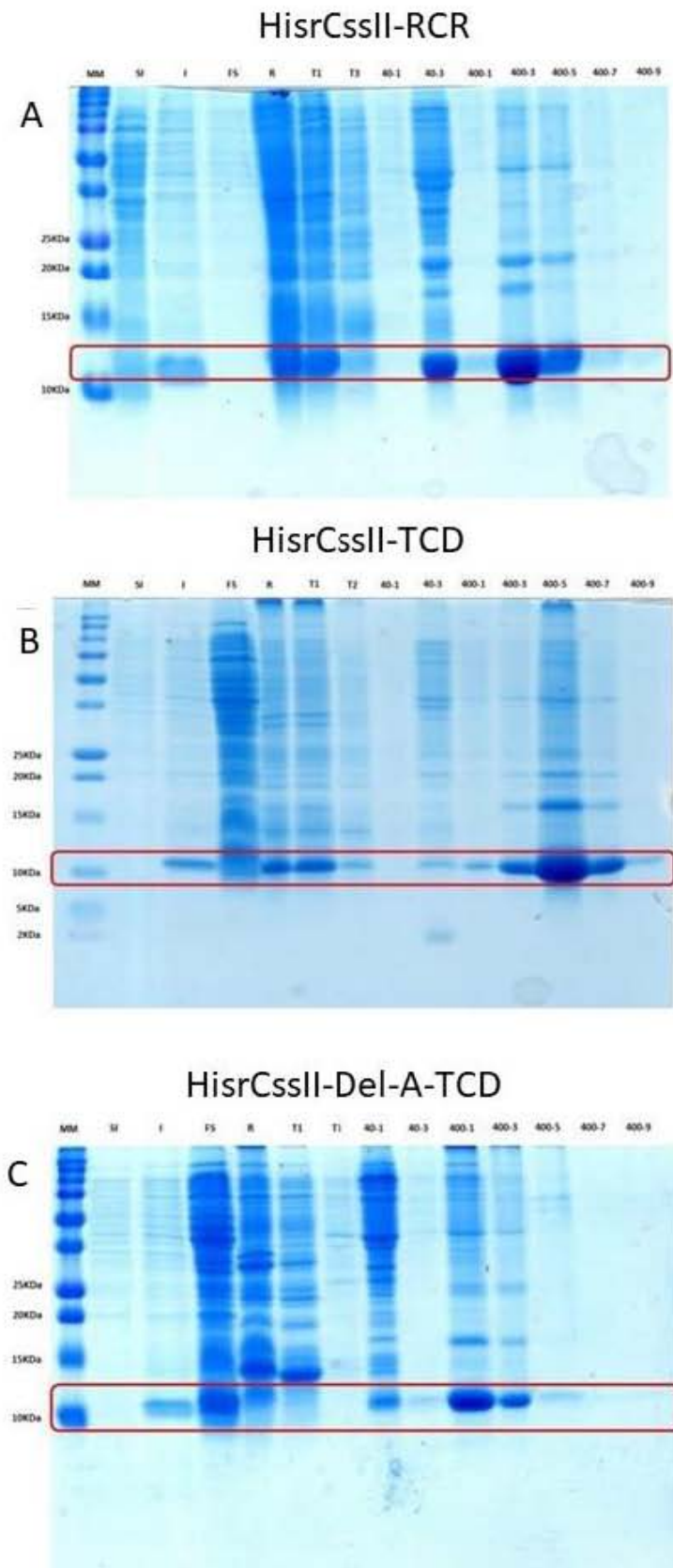


FIGURA 2

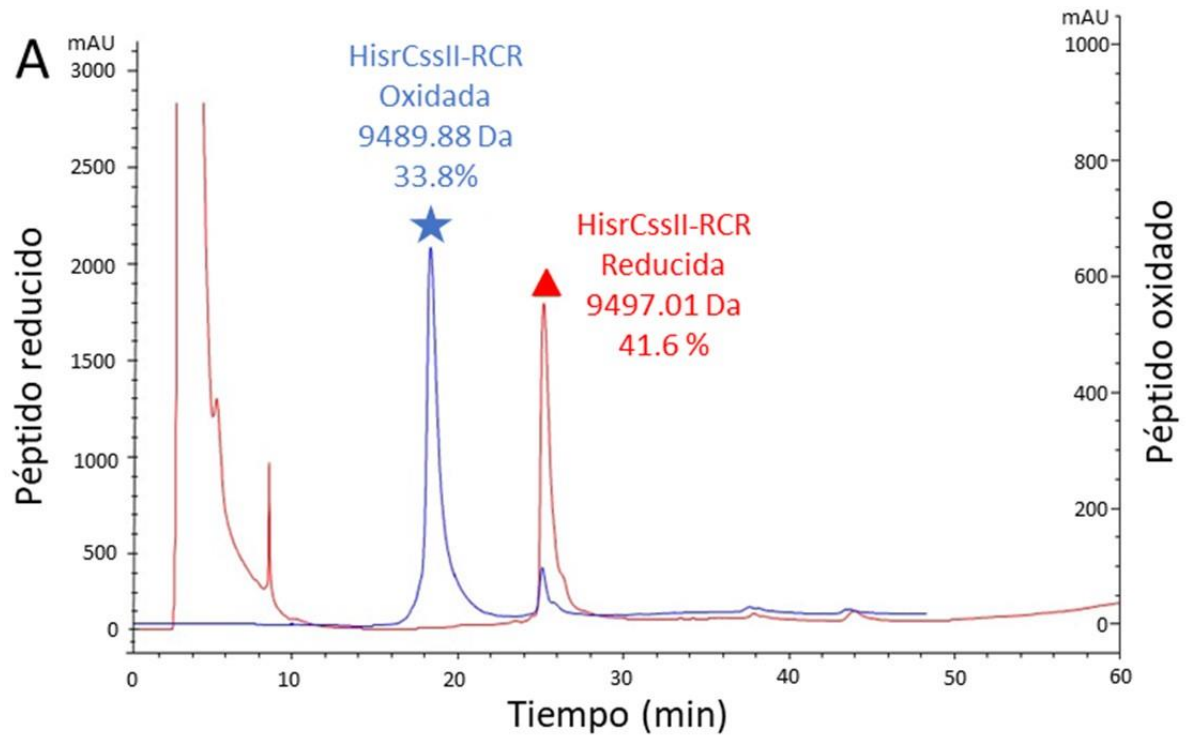


FIGURA 3

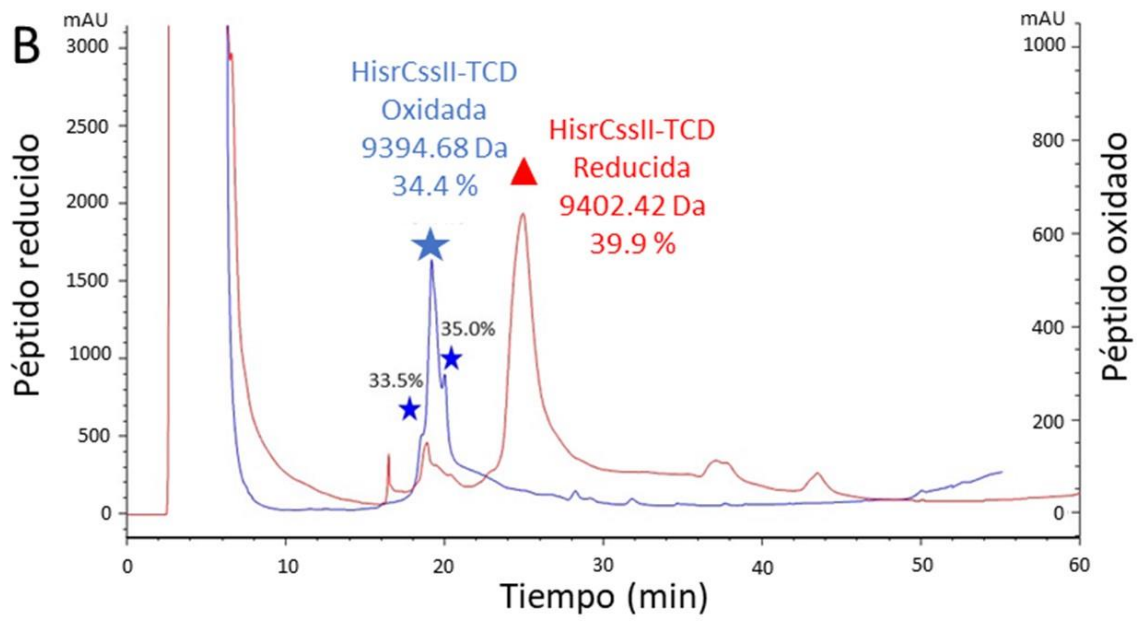


FIGURA 3

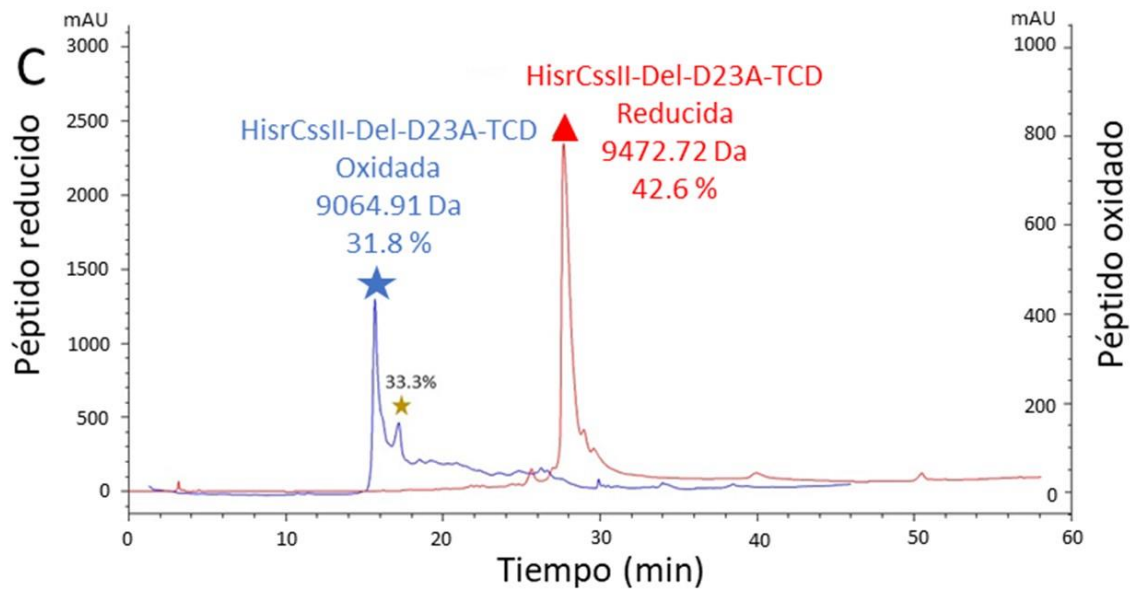


FIGURA 3

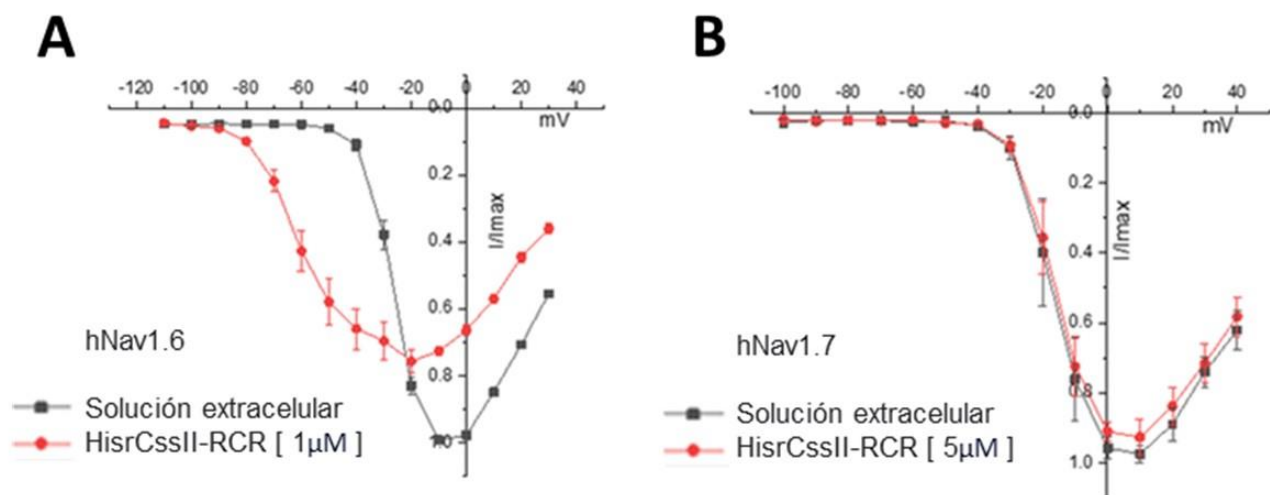


FIGURA 4

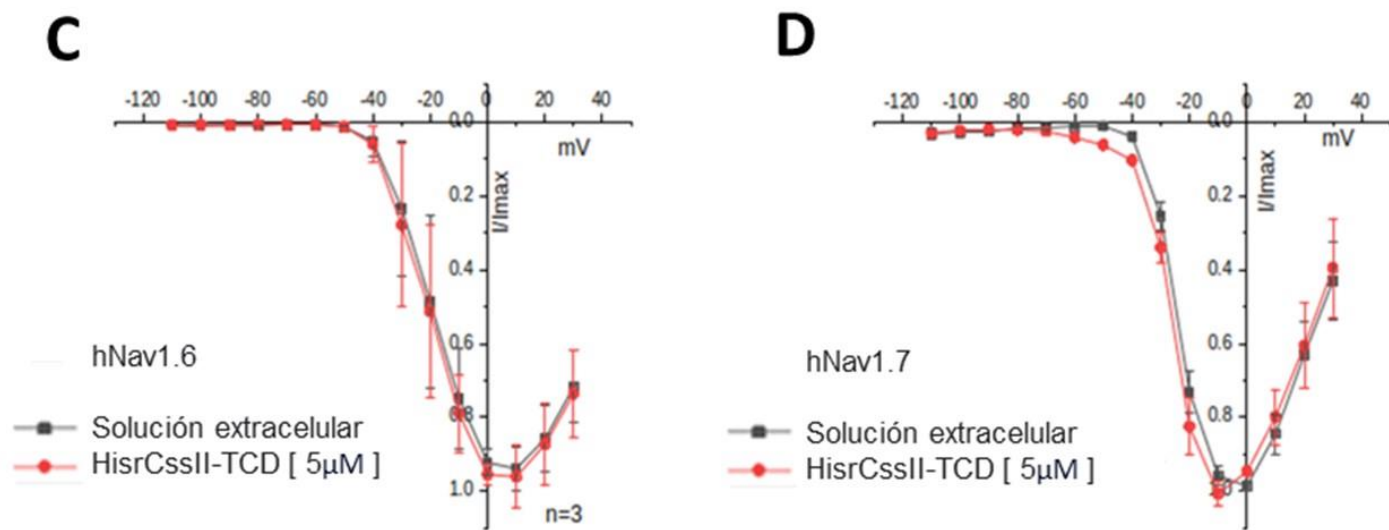


FIGURA 4

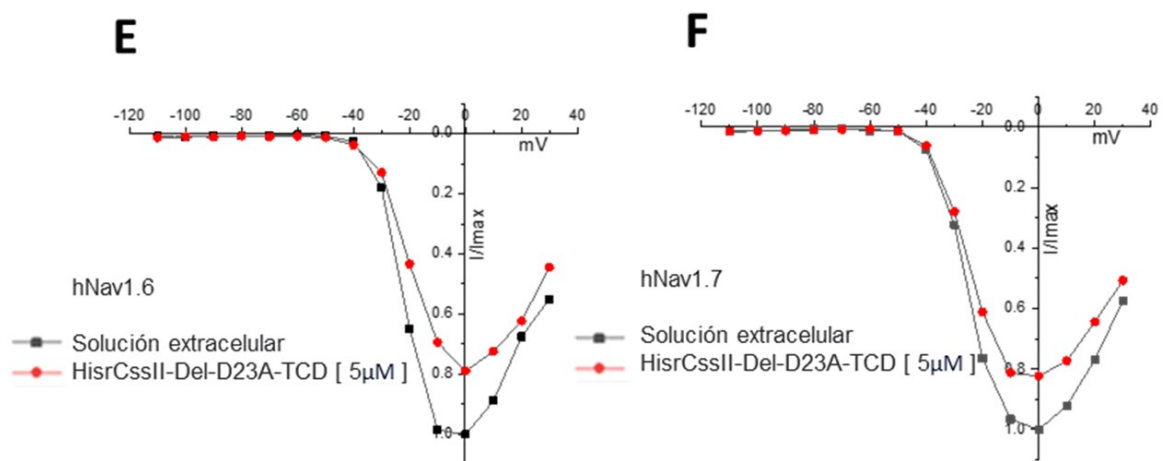


FIGURA 4

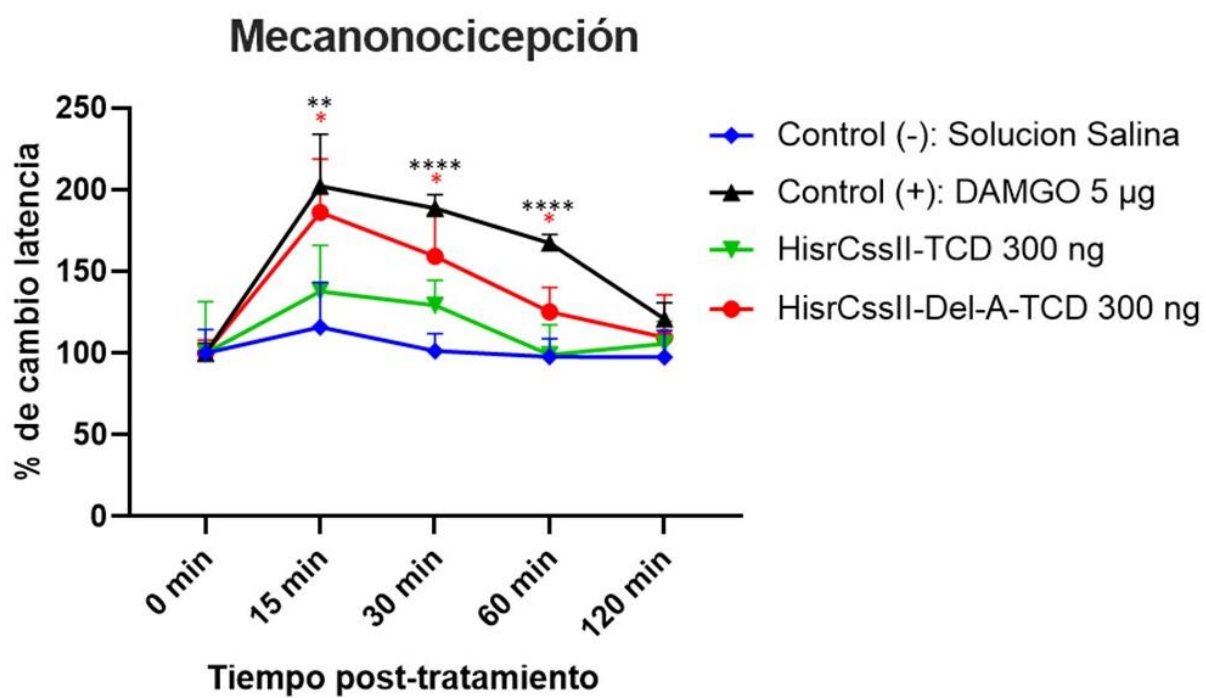


FIGURA 5

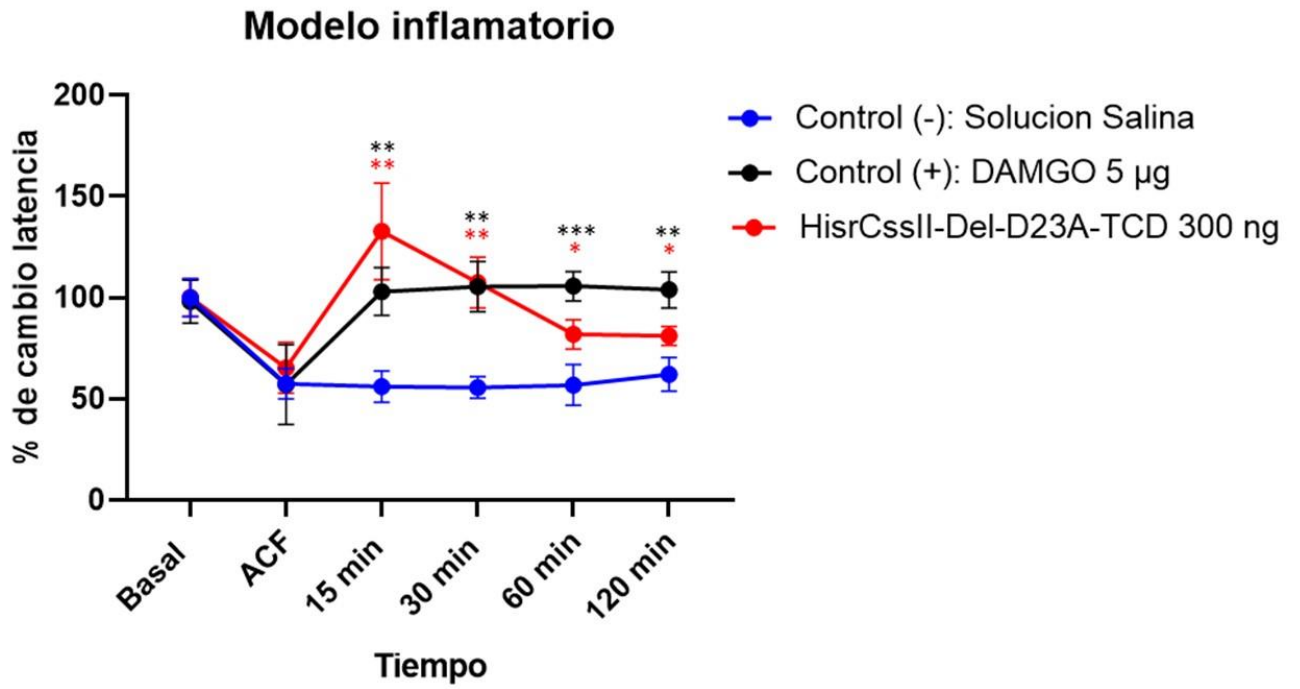


FIGURA 6

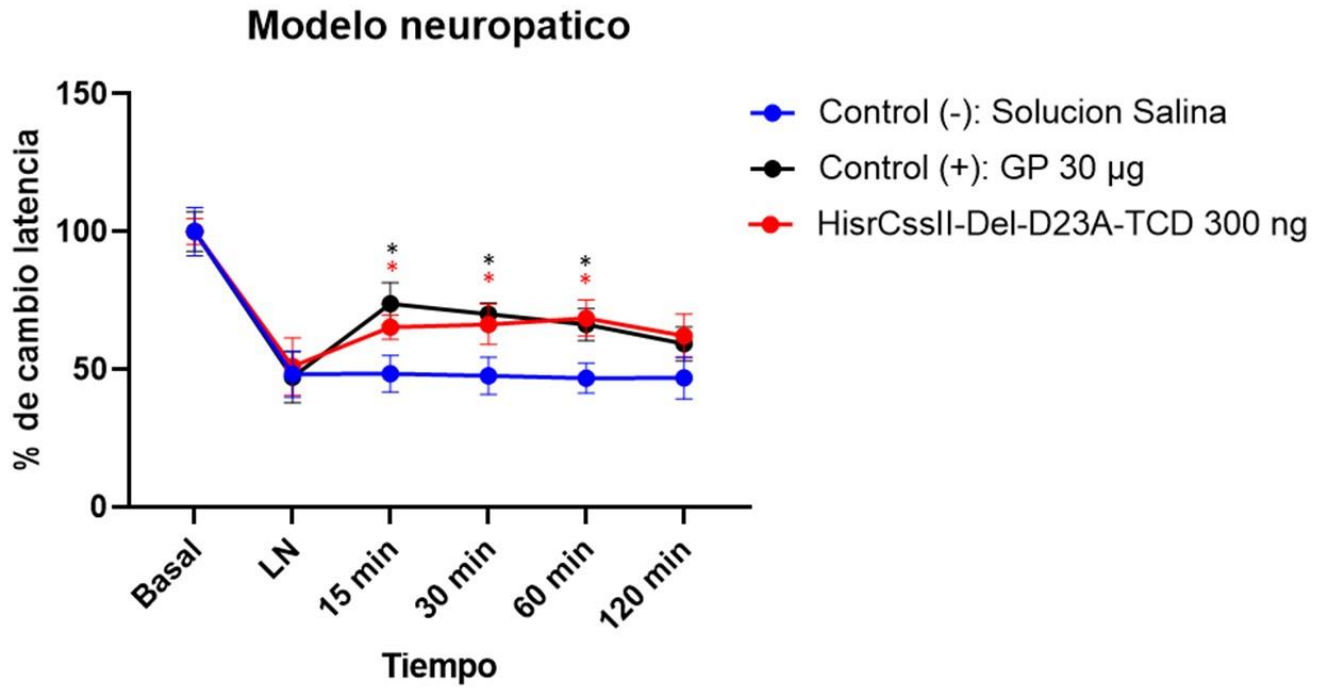


FIGURA 7

**NUEVAS VARIANTES DE PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD ANALGÉSICA PROVENIENTES
DE NEUROTOXINAS OBTENIDAS MEDIANTE EXPRESIÓN HETERÓLOGA
(Secuencias)**

Lista de secuencias

SEQ. ID NO: 1

HisrCsslI-RCR

MRGSHHHHHHGSIEGRKEGYLVSKSTGCKYECLKLGDN DYCLRECKQQYGKSSGGYCYA
FACWCTHLYEQAVVWPLPNKRCR

SEQ. ID NO: 2

HisrCsslI-TCD

MRGSHHHHHHGSIEGRKEGYLVSKSTGCKYECLKLGDN DYCLRECKQQYGKSSGGYCYA
FACWCTHLYEQAVVWPLPNKTCD

SEQ. ID NO: 3

HisrCsslI-Del-D23A-TCD

MRGSHHHHHHGSIEGRKEGYLVSKSTGCKYECLKNAYCLRECKQQYGKSSGGYCYAFAC
WCTHLYEQAVVWPLPNKTCD

SEQ. ID NO: 4

rCsslI-RCR

KEGYLVSKSTGCKYECLKLGDN DYCLRECKQQYGKSSGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWP
LPNKRCR

SEQ. ID NO: 5

rCsslI-TCD

KEGYLVSKSTGCKYECLKLGDN DYCLRECKQQYGKSSGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWP
LPNKTCD

SEQ. ID NO: 6

rCsslI-Del-D23A-TCD

KEGYLVSKSTGCKYECLKNAYCLRECKQQYGKSSGGYCYAFACWCTHLYEQAVVWPLPN
KTCD

SEQ. ID NO: 7

Fw R64T

CCTAATAAACCTGCCGCTAGTAACTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAG

SEQ. ID NO: 8

Rv R64T

AGCGGCAGGTTTTATTAGGAAGGGGCCAGACCACTGCTTG

SEQ. ID NO: 9

Fw R66D

AAACCTGCGACTAGTAACTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGA

