



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA

**Caracterización del efecto y mecanismo de acción
sobre canales ASIC de tres flavonoides obtenidos
a partir del pasto marino *Thalassia testudinum***

Tesis para obtener el título de
Doctora en Ciencias Fisiológicas

Presenta
Audrey Magdalena Ortega Ramírez

Tutores
Dr. Enrique Soto Eguibar
Dra. Rosario Vega y Saénz de Miera

Julio de 2017



Índice

Resumen.....	4
Introducción.....	6
Regulación del pH.....	6
Acid Sensing Ion Channels (ASIC).....	7
Propiedades biofísicas de las corrientes.....	8
Estructura y activación del canal ASIC.....	10
Localización y función.....	13
ASIC en procesos fisiopatológicos.....	16
Farmacología de los ASIC.....	18
Flavonoides.....	25
Estructura y clasificación.....	25
Obtención y farmacocinética.....	27
Actividades farmacológicas.....	29
Thalasiolina y sus derivados.....	32
Justificación.....	35
Hipótesis.....	36
Objetivos.....	37
Generales.....	37
Específicos.....	37
Material y Métodos.....	38
Producción de los plásmidos ASIC.....	38
Expresión de canales ASIC en un sistema heterólogo (Células CHO-K1).....	38
Cultivo de neuronas del ganglio de la raíz dorsal.....	39
Registro electrofisiológico.....	40
Análisis de datos.....	41
Análisis in silico.....	43
Resultados.....	44
Discusión.....	67
Conclusiones.....	72
Bibliografía.....	73

Agradecimientos

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurofisiología Sensorial del Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, bajo la dirección del Dr. Enrique Soto Eguibar y la Dra. Rosario Vega.

Audrey Magdalena Ortega Ramírez tuvo una beca de CONACyT para sus estudios de Doctorado número 226512.

Se agradece a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del Programa II. Investigación y Posgrado. Aseguramiento de la calidad en el Posgrado, Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2013-2017.

El trabajo fue financiado con apoyo de una subvención del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT 2016-01-1544 a ES, PROFOCIE 2016 y apoyos VIEP-BUAP 2016 y 2017 a RV y ES.

Resumen

En este trabajo se estudió el efecto de los flavonoides crisoeriol, crisoeriol 7-O-β-D-glucopiranosido y thalasiolina B, obtenidos a partir del pasto marino *Thalassia testudinum*, sobre las corrientes iónicas ASIC (subunidades 1a, 1b, 2a y 3) expresadas en células CHO-K1 mediante la técnica de lipotransfección. 48 hrs. después de la transfección las células respondieron a la exposición de un pulso ácido, produciendo una corriente entrante sensible a amilorida y cuyas propiedades biofísicas dependieron del tipo de subunidad expresada. Crisoeriol 7-O-β-D-glucopiranosido (100 μM) produjo una inhibición reversible sobre la corriente al pico (I_{pico}) de la subunidad ASIC1a ($13 \pm 3\%$) con el protocolo de co-aplicación, sin embargo no se observó ningún efecto sobre las demás subunidades ni con los otros protocolos de aplicación. Por su parte thalasiolina B (ThB) a una concentración de 100 μM mostró tener un efecto bifásico durante el protocolo de aplicación sostenida inhibiendo la corriente al pico de las subunidades ASIC2a ($17 \pm 2\%$) y ASIC3 ($5 \pm 1\%$) e incrementando la I_{pico} de la subunidad ASIC1b ($18 \pm 4\%$). Durante la co-aplicación el efecto de ThB fue únicamente inhibitorio, afectando la I_{pico} de las subunidades ASIC1a ($18 \pm 4\%$), 1b ($8 \pm 4\%$) y 2a ($18 \pm 2\%$), mientras que no tuvo efecto significativo con el protocolo de pre-aplicación. Crisoeriol produjo una inhibición en todas las corrientes homoméricas ASIC bajo todos los protocolos de aplicación. La subunidad menos afectada fue ASIC1a, el efecto inhibitorio sobre la I_{pico} varió dependiendo del protocolo de aplicación (co-aplicación = $17 \pm 2\%$, pre-aplicación = $25 \pm 2\%$ y aplicación sostenida = $27 \pm 4\%$), mientras que los mayores efectos inhibitorios de crisoeriol se observaron sobre la subunidad 2a, durante la co-aplicación la inhibición sobre fue de $59 \pm 2\%$, con la pre-aplicación se inhibió el $34 \pm 6\%$ y con el protocolo de aplicación sostenida se obtuvo una inhibición del $72 \pm 2\%$ sobre la I_{pico} . Cabe señalar que los efectos producidos por thalasiolina B y crisoeriol fueron completamente reversibles.

Debido a que el mayor efecto observado fue el producido por crisoeriol sobre la I_{pico} de la subunidad ASIC2a, realizamos las curvas dosis-respuesta para este flavonoide y la subunidad 2a con cada protocolo de aplicación, encontramos

concentraciones inhibitorias medias de 36 ± 6 para aplicación sostenida, 34 ± 4 para pre-aplicación y 54 ± 8 para co-aplicación.

Finalmente realizamos el modelaje *in silico* para conocer los potenciales sitios de unión de crisoeriol al canal ASIC, observamos que crisoeriol se une preferentemente a la porción extracelular del canal a nivel del residuo D⁷⁹ y del vestíbulo central.

Estos resultados demuestran que de los flavonoides probados, crisoeriol no solo es capaz de inhibir la corriente ASIC producida por cada una de las subunidades, si no que dicha inhibición es mucho más marcada en comparación con los otros compuestos que si bien también son flavonoides tienen unidos grupos azúcares y sulfatos, lo cual puede afectar su actividad. Por todo lo anterior podemos decir que crisoeriol es un potente inhibidor no selectivo para los ASICs y puede ser una molécula de interés en la farmacología de estos canales.

INTRODUCCIÓN

Regulación del pH

En el organismo la regulación del pH dentro de los límites fisiológicos (7.35 a 7.44) es esencial para el mantenimiento de la homeostasis, debido a que la concentración de H^+ juega un papel determinante en reacciones enzimáticas, bioquímicas y moleculares, así como en la modulación de diversos tipos de receptores presentes en las membranas celulares, pese que existen una serie de procesos encargados del amortiguamiento del pH, durante condiciones fisiológicas y fisiopatológicas el flujo de iones puede producir fluctuaciones localizadas de pH (Carrillo-Esper y Visoso-Palacios 2006; Magnotta et al., 2012). La acidificación extracelular puede producirse en situaciones patológicas tales como la inflamación y la isquemia cerebral, así como también en condiciones fisiológicas normales tales como la transmisión sináptica y la actividad neuronal.

Las oscilaciones de pH están finamente reguladas y se presentan en regiones delimitadas del organismo. En el tejido cerebral normal por ejemplo, la sola actividad neuronal es capaz de causar cambios de pH transitorios y localizados, esto a través de varios mecanismos, uno de ellos es el aumento del metabolismo de carbohidratos el cual produce una caída del pH debido a la producción de compuestos resultantes como el ácido láctico y CO_2 , esto activa transportadores HCO_3^- que pueden modificar el pH extracelular (Chesler 2003). Dichas fluctuaciones del pH afectan diversos procesos celulares produciendo modificaciones en la estructura celular y la actividad enzimática además de la modulación de receptores de membrana y varias corrientes iónicas tales como receptores purinérgicos (P2X 1-4), metabotrópicos (acoplados a proteína G), GABAérgicos (GABA), glutamatérgicos (alfa-metil-isoxasole-propiónico-ácido receptor (AMPA) y N-metil-D-aspartico-ácido (NMDA)), canales de calcio de alto y bajo umbral, corriente de Ca^{2+} activada por K^+ y la corriente hERG (human Ether à-go-go Related Gene) (Spray et al., 1981; Parton et al., 1991; Stoop et al., 1997; Krishek et al., 2001; McDonald et al., 1998; Traynelis y Cull-Candy 1990; Banke et

al., 2005; Jensen et al 2005, Kehl et al 2002; Shah et al 2001; Almanza et al 2008; Anumono et al., 1999).

Acid Sensing Ion Channels (ASIC)

Los canales ASICs (por sus siglas en inglés *Acid Sensing Ion Channels*) son canales iónicos sensibles a cambios de pH extracelular que forman parte de la súper familia ENaC/DEG (del inglés Epitelial Na⁺ Channel/Degenerin) por lo que son insensibles a voltaje, permiten principalmente el paso de Na⁺ y son bloqueados inespecíficamente por el diurético amilorida (Lingueglia 2007).

Provenientes de 5 genes se han reportado 7 subunidades ASIC (1a, 1b, 2a, 2b, 3, 4, 5), cada una de las cuales está formada por dos segmentos transmembrana unidos por una gran asa extracelular y sus dominios amino y carboxilo terminales se encuentran localizados intracelularmente. En el 2007 Jasti y colaboradores demostraron a través de la cristalografía del canal homomérico ASIC1a de pollo, que se requieren 3 subunidades para formar un canal funcional, el cual puede ser homo o heteromérico; todas las subunidades con excepción de ASIC2b y 4 son capaces de formar homómeros funcionales (Jasti et al. 2007).

Dependiendo de las subunidades que conformen al canal las corrientes iónicas obtenidas tendrán diferente cinética y sensibilidad farmacológica. Pese a que las subunidades ASIC2b y 4 no son capaces de formar homómeros funcionales pueden contribuir a la formación de canales heteroméricos, modulando su actividad. Trabajos recientes han demostrado que heterómeros ASIC1a y 2a no tienen ninguna preferencia estequiométrica, lo cual sugiere que la estequiometría en los canales heteroméricos ASIC está determinada principalmente por los niveles de expresión de cada subunidad (Bartoi et al. 2014).

Propiedades biofísicas de las corrientes ASIC

Las propiedades electrofisiológicas de los canales ASICs (pH_{50} de activación, pH_{50} de desensibilización, tau de activación, tau de inactivación y recuperación de la desensibilización) así como su sensibilidad farmacológica varían dependiendo de las subunidades que formen el canal, aunque existen características uniformes para todos los tipos de canales ASIC tales como su permeabilidad a Na^+ , insensibilidad a voltaje e inhibición inespecífica por amilorida.

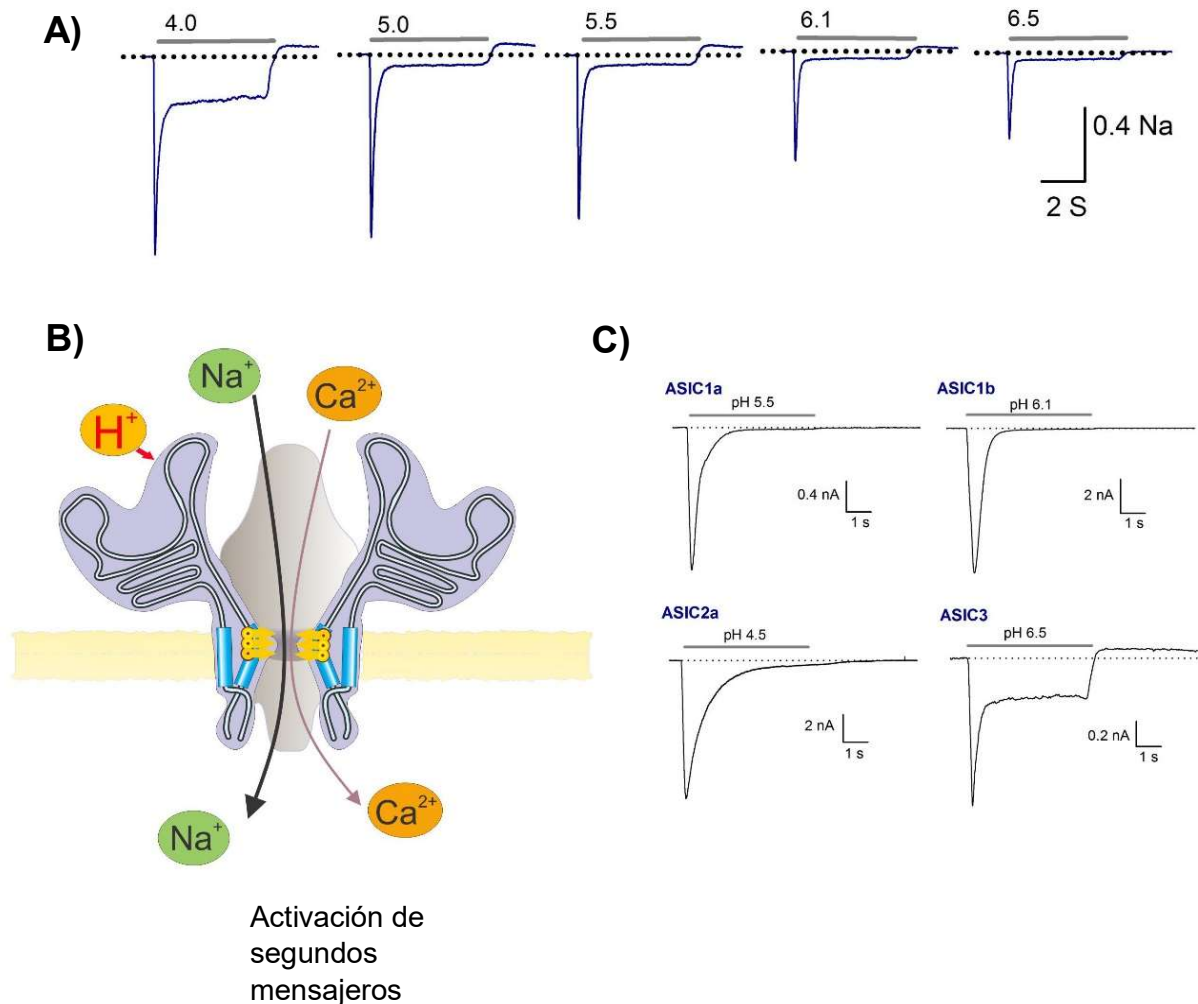


Figura 1. **A)** Dependencia de pH de la corriente producida por homómeros ASIC3 ($pH_{50} = 6.5$). **B)** Estructura del canal ASICs, se observa el sitio de unión a protones, el paso principalmente de Na^+ a través del canal y para el caso de homómeros ASIC1a y heterómeros 1a/2b también Ca^{2+} , este último permite la activación de mensajeros intracelulares. **C)** corrientes homoméricas activadas por pH ácido expresadas en células CHO-K1, las subunidades 1a y 1b presentan una cinética con activación e inactivación rápida, la subunidad 2a muestra una rápida activación y una inactivación lenta mientras que la subunidad 3 presenta una rápida activación y una inactivación parcial con una componente sostenido muy marcado.

Para saber más en cuanto al comportamiento de los canales y los diferentes tipos de corrientes que pueden conducir, se han caracterizado las corrientes homoméricas y heteroméricas ASIC1a, 1b, 2a y 3 empleando sistemas de expresión heteróloga como ovocitos de *Xenopus* y diferentes líneas celulares (COS7, HEK y CHO entre otras) (Hesselager et al. 2004; Grunder and Pusch 2015). En términos generales las corrientes presentan una cinética de rápida activación y desensibilización parcial (Figura 1). Para el caso de ASIC1a la tau de activación (T_{act}) a pH de 6.0 es de 6-14 ms mientras que la T_{act} para ASIC3 es aproximadamente 5ms más rápida, para ambas activaciones se obtienen números de Hill mayores a 1, lo cual sugiere la unión cooperativa de más de un protón para producir la apertura del canal.

El proceso de desensibilización de los canales ASIC se debe a la presencia continua de protones (H^+). Los ASICs de mamífero presentan una desensibilización relativamente lenta pues tienen constantes de desensibilización (T_{desens}) que van desde algunos cientos de milisegundos a segundos, por ejemplo la T_{desens} reportada para ASIC1a es de 1.2-3.5s mientras que para el ASIC3 es de solo 300 ms, es importante resaltar que algunos canales como el ASIC3 no desensibilizan por completo y presentan una corriente sostenida la cual diferencia de la corriente transitoria (selectiva principalmente para Na^+) no es selectiva (Yagi et al. 2006); cabe señalar que el porcentaje de desensibilización para las corrientes producidas por homómeros 1a, 1b y 2a incrementa significativamente al disminuir el pH (Grunder and Pusch 2015)

En el caso de ASIC1a la activación repetitiva del canal provoca un aumento en el tiempo que permanece desensibilizado, produciendo con ello una taquifilaxis de la corriente la cual es mucho más pronunciada a pH más ácidos y cuya función actualmente se desconoce, pero se sugiere que se da para reducir el paso de protones y Ca^{2+} a través del canal (Chen and Grunder 2007).

En células que co-expresan las subunidades ASIC1a y ASIC1b, la desensibilización de la corriente es significativamente más lenta que la observada en cualquier otro canal homomérico, mientras que su sensibilidad al pH es prácticamente la misma.

Estructura y activación del canal ASIC

Cada una de las subunidades ASIC está formada por dos segmentos transmembranales (TM1 y TM2) los cuales se unen a través de una gran asa extracelular (~370 residuos aminoácidos) cuya secuencia presenta un número conservado de cisteínas y residuos ácidos, las cisteínas participan en el plegamiento de la proteína, mientras que los residuos ácidos proveen a la superficie del canal de una importante densidad de cargas negativas, por su parte las porciones NH₂ y COOH terminal se encuentran intracelularmente (Kellenberg et al. 2002, Cushman et al. 2007).

La estructura cristalográfica del canal homomérico ASIC1a de pollo demostró que los canales funcionales se ensamblan en trímeros (Jasti et al. 2007, Paukert et al. 2008), los cuales pueden ser homo o heteroméricos, aunado a ello recientemente el grupo de Schild a través de estudios bioquímicos ha sugerido que los ASICs también son capaces de formar tetrámeros (Van Bemmelen et al. 2015).

La porción extracelular del canal ASIC posee una forma similar a la de un cáliz. Cada una de las subunidades ASIC se asocia en una disposición de triple eje para formar un canal trimérico, el cual presenta en la porción extracelular numerosas fenestraciones y sitios de contacto intersubunidades. Se ha propuesto que debido a la estructura tridimensional del canal el segmento extracelular de cada subunidad asemeja a una mano cerrada, las subregiones en dicho dominio incluyen: la muñeca, la palma, el dedo, nudillo, pulgar y el domino de la bola β (Figura 2). El dominio de la “muñeca” conecta el área de la “mano” (palma, dedo, nudillo, pulgar y bola β) a los dominios transmembrana a través de dos bucles muy bien ordenados, mientras que la región de la bola β se encuentra entre la palma, el pulgar y la punta del dedo.

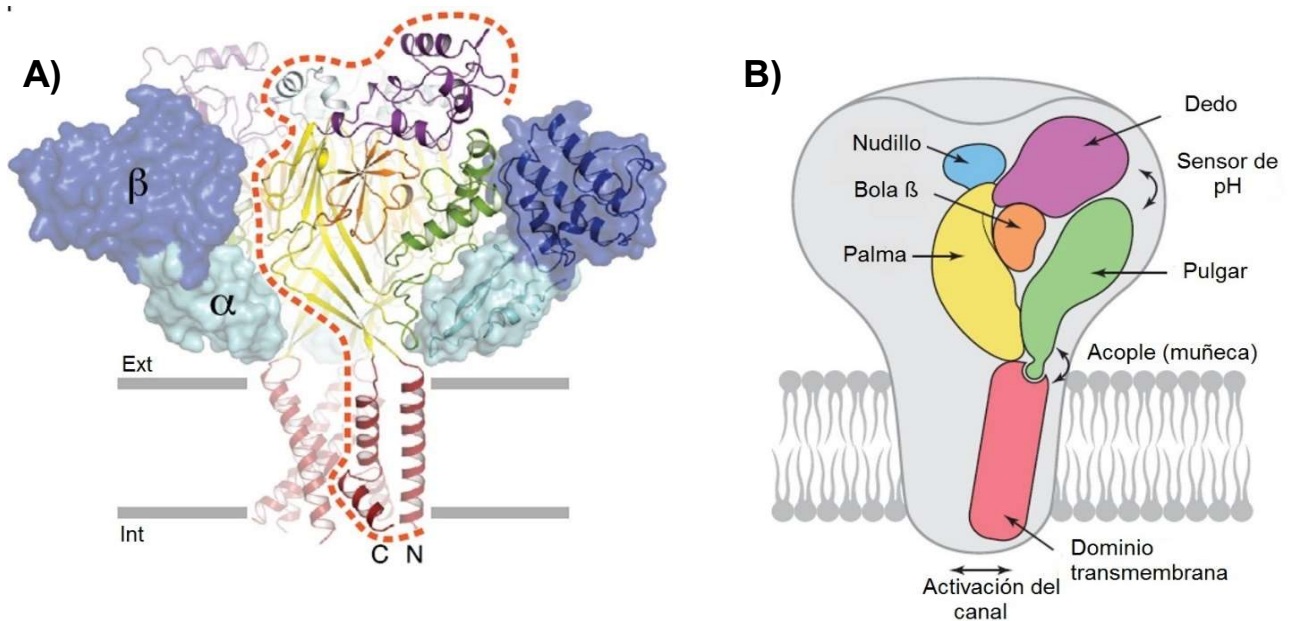


Figura 2 Estructura de la subunidad ASIC1a. A) Esquema representativo de la estructura de una subunidad ASIC en conjunto con dos subunidades más para formar un canal funcional, cada subunidad posee dos segmentos transmembrana, una gran porción extracelular y sus segmentos amino y carboxilo terminal son cortos e intracelulares. En B) se esquematizan las regiones que forman a la porción extracelular de la subunidad (modificado de Jasti et al. 2007 y Bacongus et al. 2014).

Una de las regiones de contacto entre subunidades que juega un papel importante es “el bolsillo ácido” pues se relaciona con la modulación y la apertura del canal mediada por protones. La región del bolsillo ácido está formada por el pulgar y el dedo de una subunidad en unión con la región superior de la palma de la subunidad adyacente, se ha propuesto que los residuos aminoacídicos de esta región son los responsables de la sensibilidad a protones en estado desensibilizado y la activación del canal (Yu et al. 2010). La unión trimérica de las subunidades ASIC forma cuatro vestíbulos acuosos (superior, central, extracelular e intracelular) que se encuentran dispuestos verticalmente dentro del núcleo central del canal y tienen potenciales electrostáticos muy negativos, se ha sugerido que dichos vestíbulos actúan como un “reservorio de cationes” al concentrar los cationes cerca del poro del canal, con lo cual se produciría un aumento en la conductancia del mismo (Figura 3) (Sherwood et al. 2012; Gonzales et al. 2009).

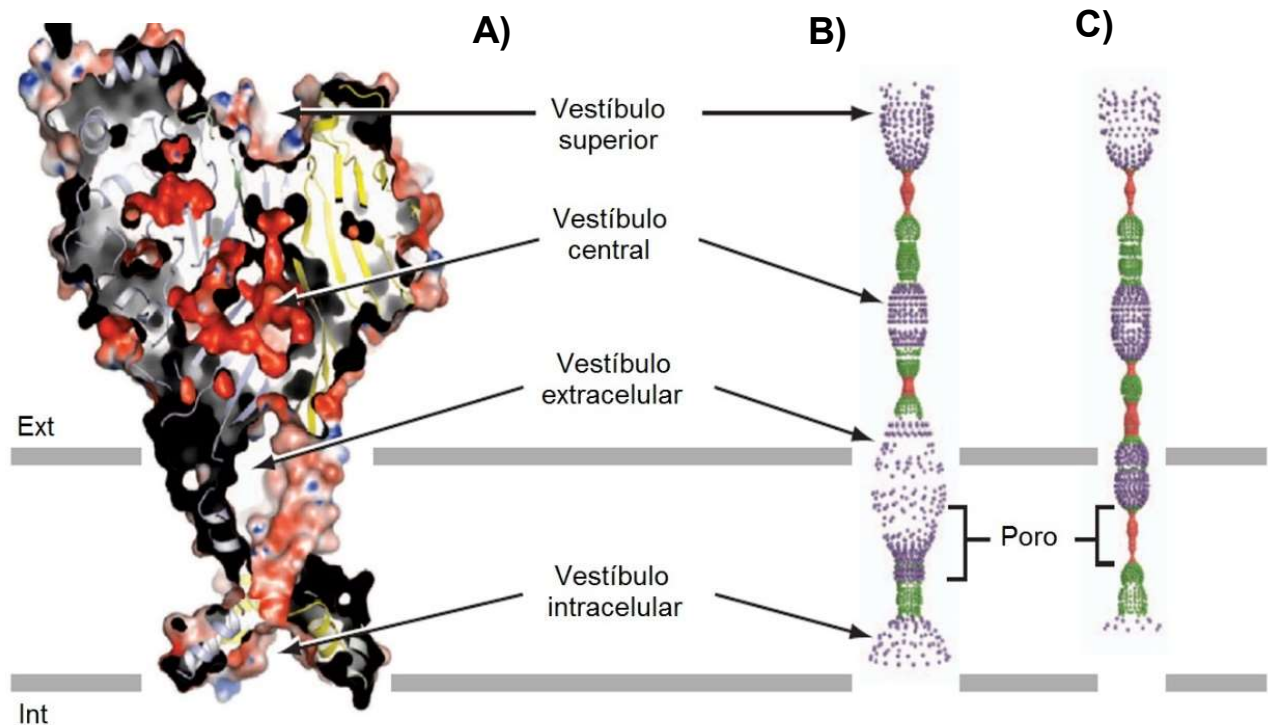


Figura 3. Estructura del canal ASIC y sus vestibulos. **A)** se muestra el potencial electrostático del canal cuando se encuentra unido con la toxina MitTx. **B)** Estructura del poro y los vestibulos del canal durante el estado abierto debido a la unión de MitTx. **C)** Estructura de poro y los vestibulos del canal durante el estado desensibilizado (radio del poro: rojo <math>< 1.15 \text{ \AA}</math> <math>< 2.3 \text{ \AA}</math> <math>< \text{morado}</math>). Tomado y modificado de Bancoguis et al. 2014.

Los dominios NH_2 y COOH terminales se encuentran intracelularmente y juegan un papel importante en procesos tales como la apertura del canal, la permeabilidad iónica, el posicionamiento del canal a la superficie de la membrana y la modulación del canal por moléculas intracelulares (Sherwood et al. 2012; Jing et al. 2013).

En cuanto a la activación, los ASIC son activados por un incremento en la concentración extracelular de protones, estos canales usualmente desensibilizan/inactivan rápidamente. La exposición de los ASIC a un pH moderadamente ácido (no lo suficientemente bajo como para generar una activación sustancial de la corriente) o la acidificación lenta del pH extracelular produce una desensibilización en estado estacionario después de la cual son incapaces de responder a disminuciones adicionales de pH.

Localización y función

Los canales ASICs se encuentran ampliamente distribuidos en sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP). Se ha reportado la presencia de subunidades ASICs en neuronas del SNP las cuales inervan piel, corazón, intestinos, músculo estriado y liso (Price et al. 2014, Cabo et al. 2010, Yiangou et al. 2001, Molliver et al. 2005, Jernigan 2015), además de neuronas aferentes y células parareceptoras de varios órganos sensorial como retina, oído interno (vestíbulo y cóclea) y botones gustativos (Eitzaiche et al. 2006, Mercado et al. 2006, Hildebrand et al. 2004, Peng y cols. 2004, González-Garrido 2015 y Ugawa et al. 2003). Estudios inmunohistoquímicos han reportado la presencia de subunidades ASIC2 y 3 en terminales nerviosas cutáneas como los corpúsculos de Meissner y Pacini (Price et al. 2001; Cabo et al. 2012), así como en neuronas del ganglio de raíz dorsal (nGRD) en donde además de dichas subunidades se ha descrito la presencia de las demás subunidades (con excepción de ASIC5). Los canales ASICs se han relacionado con diversos procesos nociceptivos, en particular aquellos que cursan con acidificaciones tisulares, además de otras formas de nocicepción visceral (Deval y Lingueglia 2015; Holzer et al. 2015).

En el SNP se expresan todas las subunidades ASIC, de ellas ASIC3 es la más abundante y ha tomado gran relevancia en los procesos relacionados con la nocicepción debido a que responde a cambios muy pequeños de pH (de hasta 0.2 unidades), por lo que se considera la subunidad más sensitiva (Yagui et al. 2006). Además de su presencia en SNP, un número creciente de estudios ha demostrado la expresión de ASIC3 en células neuronales y no neuronales (Fig. 4), ejemplo de ello son las neuronas hipotalámicas (Meng et al. 2009), osteoclastos (Jahr et al., 2005), condrocitos (Kolker et al., 2009) y células epiteliales del pulmón (Gu y Lee, 2006) (Tabla 1).

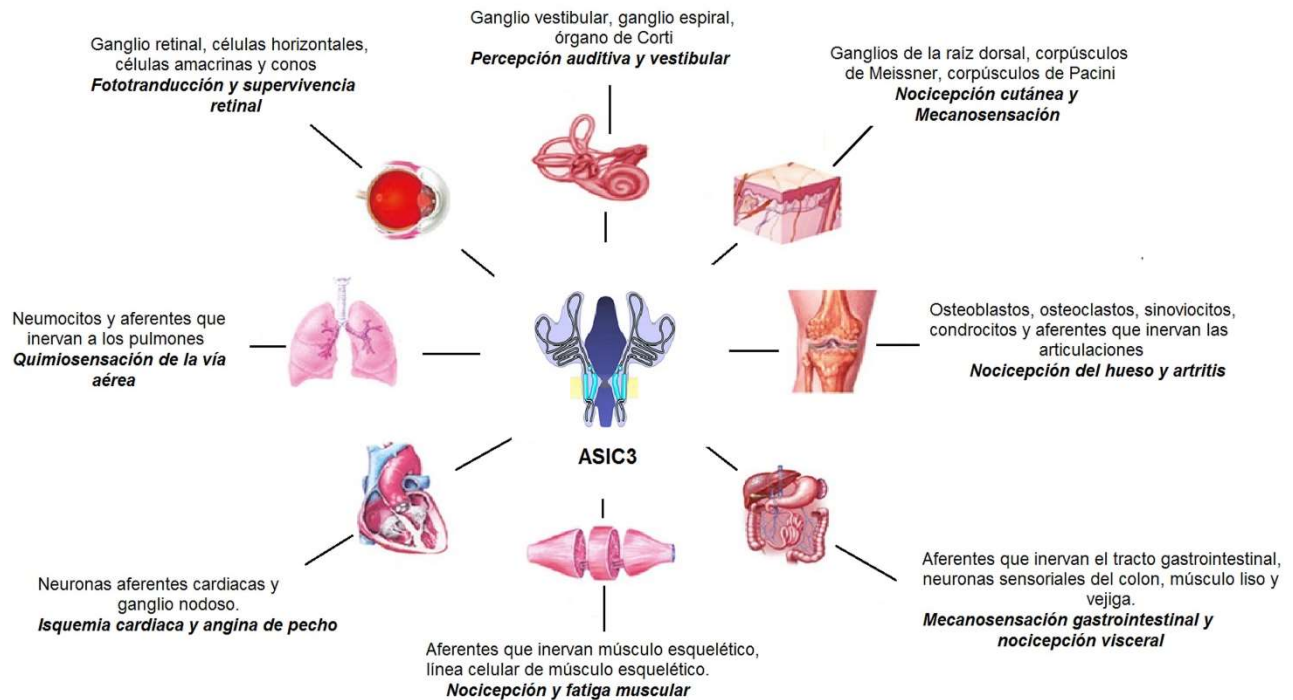


Figura 4. Distribución y función de los canales ASIC3 en el sistema nervioso periférico. Tomado y modificado de Li y Xu 2010 y Wu et al. 2012.

En el SNC las subunidades ASIC1a, 2a y 2b tienen una distribución relativamente extensa, mientras que la expresión de ASIC3 es poca (Zha y cols. 2006; Jovov y cols. 2003, Wu et al. 2016), estas subunidades se han relacionado con distintos procesos implicados en la comunicación sináptica, entre los cuales podemos mencionar la potenciación a largo plazo, formación de espinas dendríticas, condicionamiento aversivo y aprendizaje espacial (Wemmie y cols. 2002, Krishtal 2003, Bianchi y Driscoll 2002, Wemmie y cols. 2003). ASIC1a es la subunidad mayormente distribuida en SNC, pues constituye más del 50% de las subunidades ASICs expresadas en todo el cerebro, su máxima expresión se encuentra en el estriado (Wu et al. 2016). Estudios con ratones *knock out* para la subunidad ASIC1a en amígdala mostraron un aprendizaje deficiente en ensayos de condicionamiento aversivo (*fear conditioning*), así como una disminución en el nivel de ansiedad en comparación a los ratones silvestres (Ziemann et al. 2009; Wemmie et al. 2003;

Coryell et al., 2007). Los ratones *knock out* para ASIC1a recuperan las respuestas aversivas cuando se reestablece la expresión de ASIC1a en la amígdala, por lo que se ha concluido que esta subunidad es necesaria para desarrollar el comportamiento aversivo de manera normal (Wemmie et al. 2004; Ziemann et al., 2009; Coryell et al., 2008)

Subunidad	Distribución	Función Fisiológica	Referencias
1a	Cerebro, médula espinal, GRD, GT, GN, GE de la cóclea, retina, astrocitos, células epiteliales de pulmón, células del músculo liso, microglía, hueso, receptores gustativos y gliomas.	Plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria, miedo condicionado, transducción visual y auditiva, mecanopercepción visceral, hiperalgesia muscular primaria, apoptosis, condroprotección y reabsorción ósea.	Deval y Lingueglia 2015, Wemmie et al., 2002 y 2003, Ettaiche et al. 2006, Page et al., 2005, Walder et al., 2010, Zheng et al. 2007, Li et al., 2014.
1b	GRD, GN, células del sistema inmune, receptores gustativos, cuerpo carotideo y células ciliadas de la cóclea (estereocilios).	Mediadores en procesos nociceptivos, transducción auditiva y barorreceptores arteriales.	Nagae et al., 2007, Deval y Lingueglia 2015.
2a	Cerebro, GRD, GN, médula espinal, retina, GE de la cóclea, astrocitos, microglía, células epiteliales de pulmón, células del músculo liso, microglía, hueso, receptores gustativos y gliomas.	Transducción visual, percepción del sabor amargo, mecanosensación, reflejo de los barorreceptores arteriales.	Deval y Lingueglia 2015; Ettaiche et al., 2006; Ugawa et al. 2003, Price et al. 2001; Lu et al. 2009.
2b	Cerebro, médula espinal, GRD, GN, GY, GE de la cóclea, retina y receptores gustativos.	Integridad de la retina, modulador de las subunidades ASIC1a, 1b, 2a y 3.	Deval y Lingueglia 2015; Ettaiche et al. 2004; Lingueglia et al. 2007; Sherwood et al., 2011.
3	GRD, GT, GN, GE de la cóclea, ganglio vagal y glosofaríngeo, cerebro, médula espinal, retina, receptores gustativos, astrocitos, microglía, testículos, condrocitos y sinoviocitos, adipocitos, células inmunes, células epiteliales del pulmón, hueso, cartílago, dientes, músculo liso y cuerpo carotideo.	Percepción de estímulos externos: sensación táctil, quimiorrecepción de ciertos metabolitos, mecanosensación de la piel, procesamiento auditivo y visual, mecanosensor del tracto intestinal.	Deval y Lingueglia 2015; Li y Xu 2010.
4	Cerebro, médula espinal, oído interno, glándula pituitaria, células inmunes y retina.	Una posible función es disminuir la cantidad de ASIC funcionales localizados en la membrana plasmática de células de mamíferos y como regulador del dolor.	Deval y Lingueglia 2015; Donier et al., 2008; Lin et al 2015.

Tabla 1. Distribución y función fisiológica de los ASICs. GRD (ganglio de la raíz dorsal), GT (ganglio trigeminal), GN (ganglio nodoso), GE (ganglio espiral), GY (ganglio yugular). Modificado de Deval & Lingueglia 2015 y Kweon & Suh 2013.

ASIC en procesos fisiopatológicos

Los canales ASICs se han relacionado con diversos procesos entre los que se encuentran: el dolor inflamatorio primario, gastrointestinal, cardiaco, post-operatorio y muscular, etc. (Yu et al. 2015; Deval y Lingueglia 2015; Wemmie et al., 2013; Page et al. 2005; Sutherland et al., 2001; Deval et al., 2011; Walder et al., 2010). Aunado a ello expresión de ASICs en las terminales nerviosas de las articulaciones y los huesos los convierten en sensores ácidos durante patologías como la artritis crónica (Heppelmann y MacDougall 2005).

En modelos animales de migraña la aplicación un estímulo ácido (pH de 5 a 6.4) directamente en la duramadre de animales despiertos produjo un comportamiento similar al del dolor de cabeza observado durante crisis migrañosas, el cual se bloqueó al aplicar inhibidores de los canales ASIC (amilorida y/o APTX2), por lo que se ha sugerido que estos canales tienen un papel importante en dicha patología (Yan et al. 2011; Dussor et al., 2015).

La presencia de canales ASICs en el SNC ha permitido relacionar su actividad con numerosos procesos neurodegenerativos; en un modelo de ratón para esclerosis múltiple (EM) se reportó que ratones *knock out* para ASIC1 presentaban una disminución en las deficiencias clínicas, así como en la degeneración axonal, comparados con los ratones *wild-type*, además la aplicación de amilorida produjo una protección significativa en los animales modelo para EM (Vergo et al. 2011; Arun et al., 2013). Contrariamente en nuestro laboratorio se encontró que la infección de células gliales con el virus de Theiler (un modelo reconocido de EM; Rubio et al. 2013), no produce cambios en la corriente ASIC registrada en astrocitos de la corteza del ratón (Soto, Mercado, Almanza, Vega y Rubio, resultados no publicados).

En 2008 el grupo de trabajo de Ziemann encontró que la expresión de ASIC1a es mucho mayor en las interneuronas gabaérgicas que en las neuronas excitatorias y que las crisis epilépticas inducidas por kainato son más largas y severas en los ratones *knock out* para ASIC1. Aunado a eso también se ha reportado la expresión de ASIC3 en interneuronas gabaérgicas inhibitorias y células gliales. En un modelo

de crisis epilépticas inducidas por pilocarpina o pentilenetetrazol el empleo de bloqueadores específicos de los canales ASIC3 (APETx2) disminuyó la latencia de las crisis, por lo que se ha sugerido que las subunidades ASIC1a y 3 participan en la terminación de las crisis epilépticas (Ziemann et al., 2008; Cao et al., 2014). Otros procesos neurodegenerativos en los que se ha demostrado la participación de estos canales son: daño isquémico neuronal, ataxia espinocerebelar y enfermedad de Parkinson (Tabla 2).

En un gran número de tejidos tumorales el pH extracelular es mucho menor en comparación con los tejidos normales, esta acidosis es una característica importante que, además, puede ser una causa directa de dolor e hiperalgesia. Estudios recientes muestran un aumento en la expresión de ASIC2a y 3 en carcinoma adenoide quístico, sugiriendo con ello que los ASICs podrían mediar la transmisión de señales intracelulares en estos tipos celulares (Ye y cols., 2007). De hecho, se ha reportado que la expresión de ASIC2a contribuye a la migración y proliferación de células tumorales (Vila-Carriles y cols., 2006).

Subunidad	Distribución	Procesos patológicos	Referencias
1a	Cerebro, médula espinal, GRD, GT, GN, GS de la cóclea, retina, astrocitos, células epiteliales de pulmón, células del músculo liso, hepatocitos, microglía, hueso, receptores gustativos y gliomas.	Dolor, inflamación, migraña, epilepsia, isquemia cerebral, fibrosis hepática, esclerosis múltiple, Parkinson, Huntington, depresión y ansiedad, migración y crecimiento de gliomas, excitotoxicidad.	Wemmie et al. 2013, Duan et al. 2007, Yan et al. 2011, Holland et al. 2012, Ziemman et al. 2008, Xiong et al. 2004, Wu et al. 2014, Vergo et al. 2011, Chu et al. 2012, Sluka et al. 2009, Berdiev et al. 2003.
1b	GRD, GN, células del sistema inmune, receptores gustativos, cuerpo carotideo y células ciliadas de la cóclea (estereocilios).	Dolor, inflamación y cáncer.	Deval et al. 2010, Wemmie et al. 2013.

2a	Cerebro, GRD, GN, médula espinal, retina, GE de la cóclea, astrocitos, microglía, células epiteliales de pulmón, células del músculo liso, microglía, hueso, receptores gustativos y gliomas.	Inflamación, isquemia, migración de gliomas, degeneración retinal.	Deval y Lingueglia 2015, Johnson et al., 2001, Xiong et al., 2008, Eittache et al. 2004.
2b	Cerebro, médula espinal, GRD, GN, GY, GE de la cóclea, retina y receptores gustativos.	Inflamación y degeneración retinal.	Deval y Lingueglia 2015, Voilley et al. 2004 Eittache et al. 2004,
3	GRD, GT, GN, GE de la cóclea, ganglio vagal y glossofaríngeo, cerebro, médula espinal, retina, receptores gustativos, astrocitos, microglía, testículos, condrocitos y sinoviocitos, adipocitos, células inmunes, células epiteliales del pulmón, hueso, cartílago, dientes, músculo liso y cuerpo carotideo.	Dolor, inflamación, epilepsia, migraña, dolor gastrointestinal, dolor cardiaco, dolor posoperatorio, hiperalgesia mecánica secundaria, artritis, diabetes.	Cao et al. 2016; Yan et al. 2011, Page et al. 2005, Sutherland et al., 2001, Deval et al. 2011.
4	Cerebro, médula espinal, oído interno, glándula pituitaria, células inmunes y retina.	Miedo y ansiedad	Lin et al. 2015

Tabla 2. Distribución y función patológica de los ASICs. GRD (ganglio de la raíz dorsal), GT (ganglio trigeminal), GN (ganglio nodoso), GE (ganglio espiral), GY (ganglio yugular). Tomado y modificado de Deval y Lingueglia 2015.

Farmacología de los ASIC

Los H⁺ son los principales agonistas para la activación de los ASIC pero no los únicos, con el paso del tiempo se han identificado otras moléculas capaces de activar a estos canales independientemente de la concentración de protones en el medio extracelular, dicha activación es dependiente de la concentración (DE₅₀ = concentración a la cual se observa el 50% del efecto) y la subunidad ASIC sobre la

que actúan, el amonio (NH_4^+) por ejemplo es capaz de activar a los ASICs presentes en las neuronas de la sustancia *nigra pars compacta* (principalmente ASIC1a) (Pidoplichko y Dani 2006), mientras que otras moléculas como 2-guanidina-4-metilquinazolina (GMQ), la agmantina y la arcaína tienen acción específica en los canales homoméricos ASIC3 y heteroméricos 3/1b activándolos y produciendo una corriente de tamaño considerable y con poca o ninguna desensibilización (Yu et al. 2010). A partir del veneno de la serpiente coral de Texas (*Micrurus tener tener*) se obtuvo la toxina MitTx, la cual a diferencia de otras toxinas está formada por dos subunidades proteicas: MitTx α y MitTx β . Cada una de estas subunidades posee características específicas; MitTx α es una toxina tipo Kunitz mientras que la MitTx β es una toxina tipo fosfolipasa A2. El complejo MitTx actúa como un agonista potente de los canales ASIC, pues tiene una eficacia igual o mayor a la de los protones. En condiciones normales de pH, MitTx es altamente selectiva para ASIC1 ($\text{DE}_{50} = 9.4$ nM) y bajo condiciones de pH ácido ($\text{pH} < 6.5$) es capaz de producir una potenciación (< de 100 veces) en la corriente originada por ASIC2a (Bohonen et al 2012).

Al igual que los canales pertenecientes a la familia de las ENaC/Degenerinas los ASICs tienen como inhibidor inespecífico al diurético amilorida, el cual produce una inhibición dependiente de la concentración y de la subunidad ASIC sobre la que actué; ASIC1a es la más sensible pues tiene una DE_{50} de tan solo 10 μM , mientras que para ASIC3 se necesitan concentraciones más altas para producir solo una inhibición de la corriente al pico debido a que el componente sostenido es resistente al bloqueo por amilorida ($\text{DE}_{50} = 60\text{-}100$ μM) (Kellenberger y Schild 2002).

Sobre los canales ASICs actúan diversos tipos de moduladores (aumentando o disminuyendo su actividad), los cuales pueden ser exógenos o endógenos (Tabla 3). Dentro de los moduladores exógenos se han descrito dos toxinas peptídicas que tienen un efecto inhibitorio selectivo sobre algunas subunidades ASIC, una de ellas es la toxina proveniente de la anémona marina *Anthopleura elegantissima* (APT α 2), es una toxina peptídica de 42 aminoácidos que inhibe canales ASIC3 homoméricos así como canales heteroméricos que contengan la subunidad ASIC3 con una DE_{50}

de 63 nM a 2 μ M dependiendo de las subunidades que compongan al canal (Diochot et al., 2004). Recientemente se sugirieron dos sitios de unión putativos en el canal homomérico ASIC3 para APETx2, uno de ellos se encuentra en el área del "pulgar" y el otro entre las regiones de la "palma" y la "muñeca" (Rahman y Smith 2014). Pese a que APETx2 es un inhibidor específico para la subunidad ASIC3 no es un inhibidor selectivo de los canales ASIC, debido a que también es capaz de inhibir canales iónicos de Na⁺ dependientes de voltaje (Nav 1.8, Nav 1.2 y Nav 1.6) y de potasio hERG (human ether-á-go-go relate gene potassium channel), por lo que se ha sugerido que el efecto analgésico que produce no solo es debido a la inhibición de los canales ASIC3 (Blanchard et al 2012, Jensen et al 2014).

Por otro lado la psalmotoxina (PcTx1) aislada del veneno de la tarántula *Psalmopoeus cambridgei*, es un inhibidor potente y específico de los canales homoméricos ASIC1a (Escoubas et al 2000). La PcTx1 actúa aumentando la afinidad del canal por los H⁺ a pH 7.4, lo cual provoca que el canal pase de estado cerrado a desensibilizado; cabe destacar la gran afinidad de la toxina por el canal pues actúa a concentraciones nanomolares (EC₅₀ = 0.9 nM) (Chen et al., 2005).

Dentro de los moduladores extracelulares encontramos entonces a diferentes toxinas (APETx1, PcTx1, APTx2, MitTx, Mambalginas, Ugr 9-1, PhcrTx1 y α -dendrotoxina); compuestos vegetales (thalasiolina B, sevanol, gastrodina, puerarina, ácido clorinérgico, morfina, paeoniflorina, ligustrazina y cannabinoides), antiinflamatorios no esteroideos o AINES (ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, diclofenaco, naproxeno, flurbiprofeno, salicilato, diclofenaco, peroxicam), anestésicos (tetracaína, lidocaína y el propofol), aminoglucósidos (AGs) (estreptomina, neomicina, gentamicina, kanamicina y tobramicina) y otros moduladores como: diarilamidinas (4'-6-diamidino-2phenilindol, diminazeno, hidroxistilbamidina, pentamidina), tetraetilamonio (TEA), 4-aminopiridina (4AP), corticosterona e insulina (Tabla 3). La expresión de ASICs en neuronas nociceptivas ha impulsado el estudio del efecto de algunos fármacos relacionados con la inflamación y el dolor sobre estas corrientes; tal es el caso de los AINES, los cuales inhiben las corrientes iónicas ASICs, algunos afectando el componente sostenido y

otros actuando sobre la respuesta al pico; lo cual ha llevado a la conjetura de que la inhibición de los ASICs podría explicar, cuando menos en parte, el efecto analgésico y antiinflamatorio de estas sustancias (Voilley et al. 2001).

Moduladores Exógenos				
	Componentes	Efecto	Subunidad	Referencias
Toxinas derivadas de venenos	PcTx1	↑ la afinidad de los protones por el canal desensibilizando.	ASIC1a, 1a/2b.	Escoubas et al., 2003 y 2000.
	APTx2	↓ la corriente de ASIC3 y de heterómeros que contengan ASIC3.	ASIC3.	Diochot et al., 2004; Chagot et al., 2005.
	MiTx	↑ la sensibilidad de los protones por ASIC2a y activa los canales ASIC1a, 1b y 3.	ASIC1a, 1b, 2a y 3.	Bohlen et al., 2012
	Mambalginas	Inhibidor potente, rápido y reversible de los canales ASIC.	ASIC1a, 1b, 1a/2a, 1a/2b y 1a/1b.	Baron et al., 2013; Diochot et al., 2012.
	Ugr 9-1	↓ la corriente ASIC3, incluyendo el componente sostenido.	ASIC3 humano	Osmakov et al., 2013.
	PhcrTx1	↓ ASICs en nGRD	Todas las subunidades	Rodriguez et al., 2014
	α-dendrotoxina	↓ ASICs en nGRD.	Todas las subunidades.	Báez et al., 2015.
Compuestos Vegetales	Thalasiolina B	↓ ASICs en nGRD.	Subunidades con desensibilización < 400ms.	Garateix et al., 2011.
	Sevanol	↓ ASIC1a y 3 (incluyendo el componente sostenido).	ASIC1a y 3.	Dubinnyi et al., 2012.
	Gastrodina	↓ ASICs en nGRD.	Todas las subunidades.	Qiu et al., 2014.
	Puerarina	↓ ASICs en neuronas hipocámpicas de rata.	ASIC1a.	Zhou et al., 2013.
	Ácido clorinérgico	↓ ASICs en nGRD.	Todas las subunidades.	Qu et al., 2014.
	Morfina	↓ ASICs en nGRD.	Todas las subunidades.	Cai et al., 2014.
	Paeoniflorina	↓ ASICs en la línea celular PC12.	ASIC1a.	Sun et al., 2011.
	Ligustrazina	↓ ASICs en nGRD y heterómeros ASIC.	ASIC1a, 1b, 2a y 3.	Zhang et al., 2015.

	Canabinoides	↓ASICs en nGRD.	Todas las subunidades.	Liu et al., 2012.
AINES	Ácido salicílico, aspirina, diclofenaco, flurbiprofeno, ibuprofeno, peroxicam.	↓ homómeros and heterómeros de ASIC1a, 2a y 3.	ASIC1a, 2a y 3.	Voilley et al., 2004; Voilley et al., 2001.
	CHF5074	↓ ASICs en neuronas piramidales del área CA1.	ASIC1a.	Mango et al., 2014.
Anestésicos	Tetracaína	↓ homómeros ASIC y ASIC presentes en nGRD.	ASIC1a, 1b y 3.	Leng et al., 2013
	Lidocaína	↓ ASIC1a y heterómeros.	ASIC1a y heterómeros.	Lin et al., 2011.
	Propofol	↓ ASICs en nGRD.	Todas las subunidades.	Lei et al., 2014.
Aminoglucósidos	Estreptomina, neomicina y gentamicina	↓ ASICs en nGRD.	Todas las subunidades.	Garza et al., 2010; Mercado et al., 2014.
Monoaminas	9-aminoacridina (9AA)	↓ ASICs en neuronas hipocampales de rata y homómeros ASIC.	ASIC1a y ASIC3.	Nagüeta et al., 2015.
	Memantina	↓ ASICs en neuronas hipocampales y homómeros.	ASIC1a, 2a y 3.	Nagaeva et al., 2015.
	IEM1921	↑ la corriente ASIC en neuronas hipocampales de rata ↓ la corriente ASIC3 y potencia el componente sostenido.	ASIC1a y ASIC3.	Nagaeva et al., 2015.
	IEM2117	↑ la corriente ASIC en neuronas hipocampales y homómeros.	ASIC1a y 2a.	Nagaeva et al., 2015.
Otros	Amilorida	Inhibidor inespecífico de todas las subunidades ASIC.	Todas las subunidades.	Waldmann et al., 1997; Kellenberger et al., 2003; Bancoguis et al., 2014.
	GMQ	↑ la corriente de homómeros ASIC3 a pH neutral.	ASIC3.	Yu et al., 2010.
	Tetraetilamonio (TEA)	↓ corrientes heteroméricas ASIC	ASIC1a/2b.	Sherwood et al., 2011.
	4-aminopiridina (4AP)	↓ corrientes heteroméricas ASIC.	1a/2a y 1a/2b.	Boiko et al., 2013.
	A-317567	↓ corrientes ASIC en nGRD.	Todas las subunidades.	Dube et al., 2005.
	Mesilato de nafamostato	↓ corrientes homoméricas ASIC.	1a, 2a y 3.	Ugawa et al., 2007.

	Diarilamidinas	↓ la corriente ASIC en neuronas hipocámpales y heterómeros.	1a, 1b, 2a y 3.	Chen et al., 2010.
	Cloroquina	↓ la corriente ASICs en neuronas del ganglio retinal y expresadas en células CHO.	ASIC1a.	Li et al., 2014.
	NS383	↓ las corrientes homoméricas y heteroméricas ASIC.	ASIC1a, 3 y heterómeros formados por estas subunidades.	Munro et al., 2016
	Insulina	Regula la expresión de ASIC1a en la superficie de la membrana.	ASIC1a.	Wu et al., 2012.

Tabla 3. Moduladores exógenos de los ASICs. ↑ incrementa, ↓ disminuye, células CHO: línea celular proveniente del ovario de hámster chino (Chines ovary hamster).

En el caso de los moduladores endógenos encontramos a diversos neuropéptidos, cationes, mediadores inflamatorios, poliaminas, entre otros (Tabla 4). Los péptidos relacionados con la FMRFamida por ejemplo tienen un efecto de potenciación sobre las subunidades ASIC1a, 1b y 3, aunque no sobre ASIC2a (Deval y cols. 2003, Catarsi y cols. 2001 y Askwith y cols. 2000). El efecto neto de la FMRFamida es un aumento de la corriente al pico así como un enlentecimiento de la desensibilización. Igualmente se ha demostrado que la dinorfina actúa como un modulador que incrementa la corriente en el ASIC1a (Sherwood y Askwith, 2009).

Moduladores Endógenos				
	Componente	Efecto	Subunidad	Referencias
Neuropéptidos	Dinorfina A, gran dinorfina (big dynorpin).	↓ la sensibilidad por los protones durante la inactivación del estado estable.	ASIC1a.	Sherwood y Askwith 2009; Vick y Askwith 2015.
	FMRFamida y péptidos relacionados con FF amida de mamíferos.	↑ el componente sostenido y enlentece la inactivación.	ASIC1a, ASIC1b y ASIC3.	Lingueglia et al., 2006; Askwith et al., 2000;

				Deval et al., 2003.
Mediadores inflamatorios	Factor de crecimiento nervioso (NGF).	↑ la expresión de ASIC3 asociada con hiperalgesia.	ASIC3.	Mamet et al., 2003.
	Bradiquinina.	↑ los niveles de ARNm de los ASICs.	1a, 1b, 2b y 3.	Mamet et al., 2002.
	Serotonina.	↑ el componente sostenido de ASIC3.	ASIC3.	Wang et al., 2013; Qiu et al., 2012
	Interleucina.	↑ los niveles de ARNm de los ASICs.	1a,1b,2b y 3.	Mamet et al., 2002.
	Ácido araquidónico.	↑ la corriente al pico de los canales ASICs.	Todas las subunidades.	Smith et al., 2007.
	Óxido nítrico (ON) y donadores de ON.	↑ la corriente de ASIC1a, 1b y 3.	ASIC1a, 1b y 3.	Cardiu et al., 2007; Jetti et al., 2010.
Cationes	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Cd ²⁺ , Cu ²⁺ , Gd ³⁺ , Ni ²⁺ , Pb ²⁺ , Ba ²⁺ .	↓ la conductancia de los canales ASIC.	Todas las subunidades.	Baron y Lingueglia 2015.
	Zn ²⁺	Efecto dual. A bajas concentraciones ↓ la corriente ASICs y a altas concentraciones ↑ la corriente.	ASIC1a, 1a/2a y ASIC2a.	Baron et al., 2001; Chu et al., 2004; Jiang et al., 2011.
	NH ₄ ⁺ .	Activa la corriente ASIC a pH extracelular de 7.4.	ASIC1a.	Pidoplichko y Dani 2006.
Poliaminas	Espermina.	↑ la actividad de los canales ASIC, cambiando la inactivación en el estado estable a valores más ácidos.	ASIC1a y 1b.	Babini et al., 2002; Duan et al., 2011.
	Agmatina y arcaína.	Activa la corriente ASIC3	ASIC3.	Li et al., 2010; Yu et al., 2010.
Otros	Lactato.	↑ la corriente ASIC	ASIC1a y 3.	Immke y McClesky 2001.
	ATP.	↑ la sensibilidad a pH de ASIC3.	ASIC3.	Birdsong et al., 2010.
	Cl ⁻	↑ Enlentece la desensibilización de ASIC1a y disminuye la taquifilaxis.	ASIC1a	Kusama et al., 2010.

	H ₂ O ₂ .	↓ la corriente ASIC1a.	ASIC1a.	Zha et al., 2009.
--	---------------------------------	------------------------	---------	-------------------

Tabla 3. Moduladores endógenos de los ASICs. ↑ incrementa, ↓ disminuye, ARNm (ARN mensajero), NH₄⁺ (amonio), ATP (Trifosfato de adenosina); H₂O₂ (peróxido de hidrógeno).

Flavonoides

Estructura y clasificación

Los flavonoides pertenecen a un grupo de sustancias naturales con varias estructuras fenólicas que generalmente se pueden encontrar en vegetales, frutas, flores, nueces, semillas, té, miel y propóleo. Químicamente son estructuras fenólicas de bajo peso molecular formadas por dos anillos aromáticos bencénicos unidos por un puente de tres átomos de carbono los cuales pueden formar o no un tercer anillo, por lo cual su estructura general es C₆-C₃-C₆'. Los anillos se denominan A, B y C, mientras que los átomos de carbono son referidos por un sistema numérico, el cual emplea números ordinarios para los anillos A y C y números primos para el anillo B (Figura 5) (Nijveldt et al. 2001, Veitch y Grayer 2011).

De acuerdo a su estructura los flavonoides se han clasificado como flavonas, flavanonas, flavonoles, isoflavonas, antocianidinas, catequinas y chalconas (Figura 5). Las flavonas poseen un grupo carbonilo en la posición 4 del anillo C y carecen de grupo hidróxilo en la posición C₃, producen una coloración amarilla y están presentes en algunas flores o frutos (ej. La piel de las uvas); uno de los más conocidos representantes de este grupo es la quercetina, la cual posee un grupo carbonilo en la posición 4 y un grupo OH en la posición 3 del anillo C. Los flavonoles pueden ser amarillos o incoloros y están presentes en una gran variedad de flores.

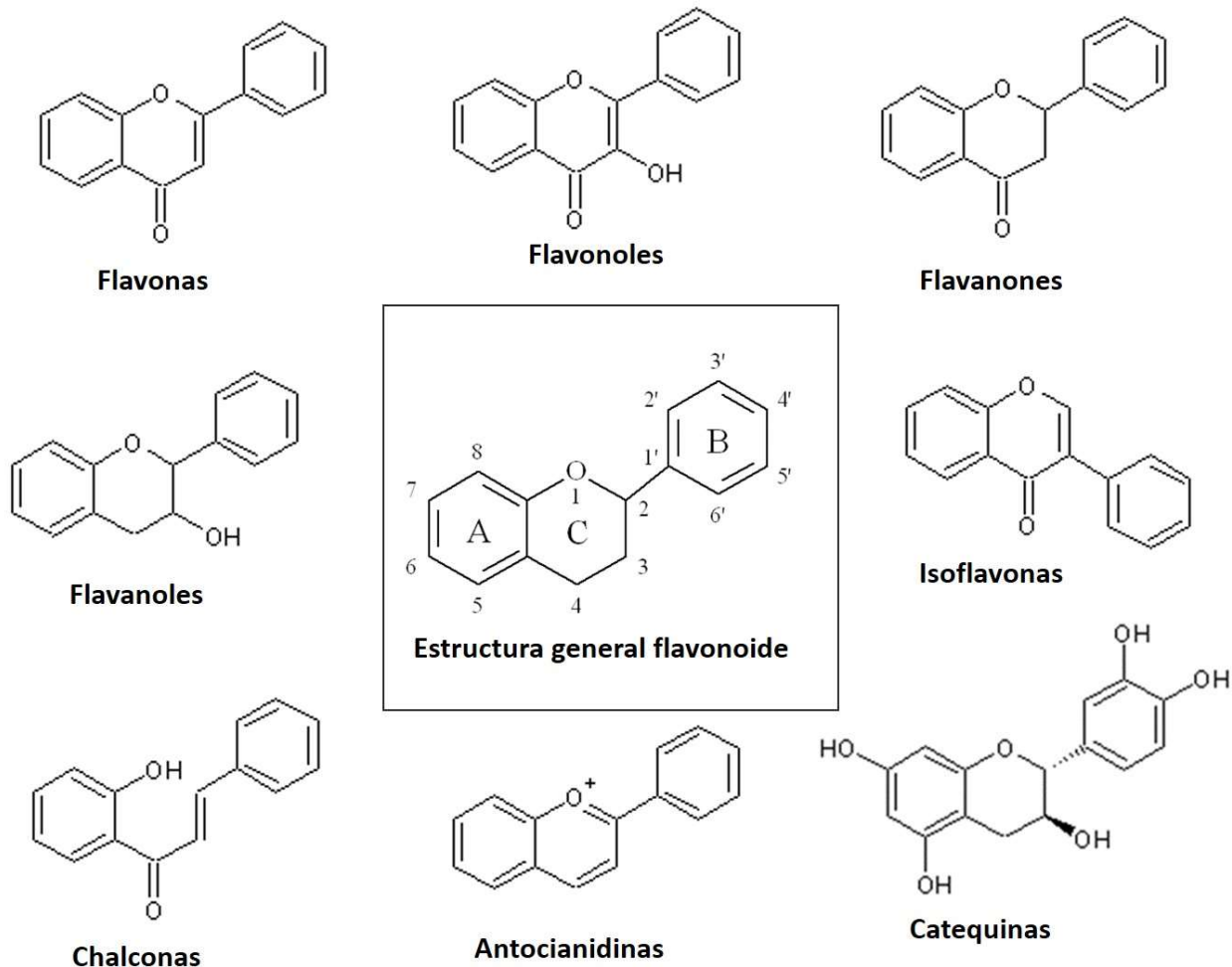


Figura 5. Estructura general de los flavonoides y sus grupos. En el centro se muestra la estructura general de los flavonoides y alrededor se encuentran las estructuras de los diversos grupos flavonoides. Modificado de Nijveldt et al., 2001 y Kumar & Pandey 2013.

A la estructura base de los flavonoles y las flavonas se unen azúcares, preferentemente en la posición C3 y con menor frecuencia al C7 del anillo A, por lo cual estos compuestos se encuentran comúnmente en la naturaleza como O-glicósidos, siendo la D-glucosa el residuo azúcar más frecuente, otros residuos azúcares que pueden unirse a estos flavonoides son la D-galactosa, L-ramnosa, L-arabinosa, D-xilosa por mencionar algunos. Cuando los flavonoides se encuentran como O-glicósidos la parte de la molécula que no tiene azúcar se denomina aglicona. La glicosilación de los flavonoides provoca que estos sean más solubles

en agua y menos reactivos. Todos los tipos de flavonoides presentan diferencias estructurales específicas, así como una gran variedad de actividades biológicas (Falcone Ferreyra et al. 2012, Veitch y Grayer 2011, Williams y Grayer 2004).

Se han sintetizado varios compuestos naturales, semi-sintéticos y sintéticos derivados de los flavonoides, los cuales, se propone tienen diferentes actividades terapéuticas, tales como anti-inflamatorias, anti-estrogénicas, antimicrobiales, anti-alérgicas, anti-oxidantes, anti-tumorales y neuroprotectoras entre otras (Cushnie y Lamb, 2005; Ahmad et al. 2015; Katyal et al., 2014; Jones et al. 2012).

Obtención y farmacocinética.

Los flavonoides se sintetizan en las plantas, donde participan en la fase dependiente de luz de la fotosíntesis catalizando el transporte de electrones; su formación se da a partir de una serie de reacciones de condensación entre el ácido cinámico o el ácido parahidroxicinámico (el anillo B y los carbonos 2, 3 y 4 del anillo C) y los residuos malonil (anillo A), con lo cual se obtiene la estructura general de los flavonoides C3-C6-C3, en la cual el puente de 3 carbonos que une a los anillos de fenilo generalmente se cicliza para formar así un tercer anillo en la estructura (anillo C). Posteriormente se forman los derivados glicosilados y/o sulfatados (Ferreyra et al. 2012; Middleton et al. 2000; Cuyckens y Claeys 2003). Estos compuestos son parte integral de la dieta humana y animal, pero debido a que son fitoquímicos ni los humanos ni los animales son capaces de sintetizarlos, por lo que los obtienen a través de la ingesta de diversos alimentos tales como frutas, vegetales, vino, té, miel, propóleo, semillas y nueces entre otros (Tabla 5); el arroz negro (*Oryza sativa*) por ejemplo es una excelente fuente de flavonoides pues contiene 51.26 mg/100g (Pedro et al. 2016). En los alimentos, los flavonoides son generalmente responsables por el color, el sabor y la prevención de la oxidación (Kumar y Pandey 2013; Ahmad et al. 2015).

Las enzimas para el metabolismo de los flavonoides están presentes en el intestino delgado, colon, hígado y riñones, y su absorción dependerá de las propiedades

fisicoquímicas de cada flavonoide, tales como tamaño molecular, lipofilicidad, solubilidad y pKa. La absorción de los flavonoides puede ocurrir en intestino delgado o en el colon, dependiendo de su estructura (glicósido o aglicona). Las agliconas se absorben fácilmente por las células de la mucosa intestinal debido a que su lipofilicidad facilita su paso a través de la bicapa fosfolipídica, mientras que los flavonoides glucósilados e hidrofílicos, se absorben al ser transportados a los enterocitos por el co-transportador intestinal de glucosa dependiente de sodio (SGLUT1) y son deglicósilados por la enzima β -glucosidasa; los glucósidos que no pueden ser transportados por medio de SGLUT1 se hidrolizan por la lactasa floricina hidrolasa (LPH) en el exterior del borde en cepillo de los enterocitos y posteriormente la aglicona liberada es absorbida a lo largo del intestino delgado. Aquellos glicósidos restantes son transportadas hacia el colon donde las enzimas de la microflora intestinal inducen su descomposición a ácidos fenólicos que pueden ser absorbidos. Después de la absorción los flavonoides se conjugan en el hígado a través de glucuronidación, sulfatación, metilación o incluso pueden ser metabolizados a pequeños compuestos fenólicos antes de entrar en circulación. Debido a estas reacciones de conjugación no es posible encontrar agliconas flavonoides libres en el plasma o la orina, excepto por las catequinas (Kumar y Pandey 2013; Katyal et al., 2014).

Después de la administración oral de flavonoides se han obtenido mediciones exactas de su concentración en plasma, tal es el caso de la baicaleína y baicalena (glicósido de la baicaleína) los cuales llegan a 100-10,000 ng/ml. Una vez en plasma, los flavonoides y sus metabolitos producen una gran diversidad de acciones biológicas. Empleando un modelo in vitro con células endoteliales cerebrales se ha demostrado que varios flavonoides y sus metabolitos conjugados son capaces de penetrar la hematoencefálica BHE, por lo que se ha sugerido que estos compuestos tienen funciones neuroprotectoras (Youdim et al. 2003; Solanki et al., 2015).

Actividades farmacológicas

Anti-oxidante

Una de las propiedades mejor descritas de los flavonoides y sus glúcidos es su capacidad para actuar como antioxidante, la cual depende del arreglo estructural de los diferentes grupos funcionales alrededor de la estructura nuclear.

Los mecanismos antioxidantes de los flavonoides incluyen:

- 1) La supresión en la formación de ROS (especies reactivas de oxígeno, por sus siglas en inglés: *reactive oxygen species*) por la inhibición de enzimas o la quelación de elementos traza involucrados en la generación de radicales libres.
- 2) La captación de ROS
- 3) La regulación positiva y/protección de las defensas antioxidantes.

La presencia, posición, estructura y número total de azúcares en la estructura flavonide (glicósidos flavonoides), tienen un importante papel en su actividad antioxidante, las agliconas tienen una actividad antioxidante más potente que sus glicósidos correspondientes. Se ha reportado que las propiedades antioxidantes de los flavonoides glicosilados obtenidos a partir del té verde disminuyen proporcionalmente con el aumento de los motivos glicósidos (Pannala et al., 2001; Nijveldt et al. 2001; Kumar y Pandey 2013).

Antibacteriana

Los flavonoides tienen una actividad antimicrobiana derivada de su capacidad para afectar tres procesos biológicos esenciales para la supervivencia de las bacterias:

- 1) Daño a la membrana citoplasmática a través de un mecanismo de perforación y un decremento en la fluidez de la membrana.
- 2) Efecto inhibitorio sobre la energía metabólica.
- 3) Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos.

La potencia del efecto antibacterial de los flavonoides es dependiente de su configuración molecular, hidrofobicidad, solubilidad, presencia o ausencia de

azúcares, así como el tipo de azúcar unida a la estructura flavonoide (Ahmad et al. 2015; Cushnie y Lamb 2015; Kumar y Pandey 2013).

Actividad antiviral

Flavonoides como rutina, morina, quercetina, apigenina, hesperidina, y catequinas han demostrado ser efectivas contra al menos 11 diferentes tipos de virus, esta actividad se ha asociado con sus componentes no glicosídicos. Se ha demostrado que los flavonoles son más activos en comparación con las flavonas para combatir el virus del herpes simple tipo I (galangina > kaempferol > quercetina) (Iranshashi et al., 2015; Ahamad et al. 2015).

La hesperidina (el mayor flavonoide presente en las frutas cítricas) al sulfonarse (hesperidina sulfonada) es capaz de inhibir completamente al virus del herpes simple tipo II y al virus de inmunodeficiencia humana (VIH) a concentraciones de 100 µg/ml, mientras que si no está sulfonada no tienen ningún efecto sobre estos virus (Garg et al. 2005). Algunos de los compuestos flavonoides incluyendo baicaleína, quercetina, la chalcona buteína, así como una serie de chalconas son capaces de suprimir el VIH-1 a bajas concentraciones (µM) y con muy poca toxicidad; se ha propuesto que la inhibición de la polimerasa viral y la unión a los ácidos nucleicos virales, así como a las proteínas de la cápside son algunos de los mecanismos de acción que llevan a cabo los flavonoides para ejercer su efecto antiviral (Mehla et al., 2011; Sharma et al., 2011; Cole et al., 2016, Kumar y Pandey 2013).

Anti-inflamatoria

La inflamación es un proceso biológico normal que ocurre como respuesta a un daño tisular, infección por patógenos e irritación química, dicho proceso implica la activación del sistema inmune y la liberación de un coctel de mediadores químicos conocido como “sopa inflamatoria”. Flavonoides como hesperidina, apigenina, luteonina y quercetina entre otros han demostrado tener efectos antiinflamatorios y

analgésicos. Se ha propuesto que los flavonoides podrían afectar la función de sistemas enzimáticos como las cinasas tirosina y serina-treonina, debido a la competencia con el ATP para unirse a sitios catalíticos de las enzimas. Algunos flavonoides inhiben la expresión de la sintasa inducible de óxido nítrico, ciclooxigenasa y lipooxigenasa las cuales son responsables por la producción de mediadores del proceso inflamatorio, tales como las citoquinas, quimiosina y moléculas de adhesión; algunos flavonoides incluso son potentes inhibidores de la producción de prostaglandinas y citosinas (Tuñón et al 2009; Leyva-López et al., 2016; Kumar y Pandey 2013).

Actividad neuroprotectora

La capacidad de los flavonoides para actuar a nivel del sistema nervioso central dependerá de su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica y llegar al cerebro. Se ha sugerido que la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica es dependiente del grado de lipofiliidad (Youdim et al 2003). Pese a esto, estudios con animales han mostrado que los compuestos glucurónidos (incluidos flavonoides glucurónidos) entran a cerebro y pueden encontrarse a concentración de 500 a 900 pmol/gr de tejido, con las cuales son capaces de producir acciones farmacológicas. Los flavonoides tienen una actividad neuroprotectora en enfermedades como la demencia, enfermedad de Alzheimer (EA), Parkinson, epilepsia e isquemia cerebral. (Spencer 2009 y 2010; Baptista et al. 2011, Jones et al. 2012).

Una de las características patológicas de la EA es la producción excesiva de la proteína β -amiloide; en estudios con modelos de EA en roedores, el uso de varios flavonoides como la nobiletina, luteolina, así como diversos polifenoles presentes en el té verde y la cascara de la uva han logrado mejorar los déficits cognitivos y disminuir la generación de proteína β -amiloide y por tanto la agregación de placas amilodes (Williams y Spencer 2012; Rendeiro et al. 2015).

Estudios de neuroprotección in vivo han demostrado que tanto el extracto como polifenoles aislados a partir del té verde previenen la pérdida de neuronas dopaminérgicas en modelos de parkinsonismo (Levites et al. 2001). Mientras que en modelos de epilepsia experimental diversos estudios han reportado que

flavonoides como rutinina, quercetina, isoquercetina, crisina y apigenina tienen efectos anticonvulsivantes gracias a su capacidad para modular canales de Cl⁻ y GABA A, debido a que tienen una estructura similar a las benzodiazepinas (Diniz et al. 2014, Wasowski y Marder 2012).

Actividad anticancerígena

Los flavonoides, así como sus análogos sintéticos han sido estudiados para el tratamiento de diversos tipos de cáncer; incluso algunos compuestos como quercetina, genisteina y flavoperidol (un análogo sintético) se encuentran ya en la última fase de ensayos clínicos para el tratamiento de varios padecimientos oncológicos. Ensayos *in vitro* en líneas celulares cancerígenas de humano (cáncer de mama, oral, tiroideo, pulmonar, prostático, de colon y leucemia) han reportado que los flavonoides tienen actividad anticancerígena a través de varios mecanismos, tales como la disminución de la actividad de algunas cinasas, inducción apoptótica, supresión en la secreción de metaloproteinasas y del comportamiento invasivo tumoral. (Le Marchand et al., 2012; Katyal et al., 2014; Ravishankar et al., 2013).

Thalasiolina y sus derivados

Los pastos marinos son plantas con flores (angiospermas) y un sistema radicular bien desarrollado (rizomas y raíces), capaces de modificar las condiciones ambientales de su entorno debido a que sus hojas atenúan la acción de las mareas y reducen la velocidad de las corrientes. Su función ecológica es amplia, son considerados hábitat crítico debido a la gran biodiversidad que sostienen y se requieren para la supervivencia de especies amenazadas o en peligro de extinción. *Thalassia testudinum* (comúnmente conocido como hierba de tortuga) es un tipo de pasto marino perteneciente a la familia *Hidrocharitaceae* que se encuentra abundantemente en las costas de Cuba y el mar Caribe, se caracteriza por la formación de grandes praderas en zonas arenosas o fangosas y poco profundas. Las praderas de *Thalassia testudinum* constituyen la dieta fundamental de la tortuga verde.

De las hojas de *T. testudinum* se obtuvo el extracto acuoso-metanólico BM-21, el cual ha demostrado poseer propiedades regenerativas, anti-oxidantes y anti-inflamatorias, además de contribuir a la recuperación del daño epidermal provocado por la radiación UV. A partir del extracto BM-21 se han aislado 11 metabolitos puros, entre los cuales se encuentran: thalasiolina A (luteolina-7-O-β-D-glucopiranosil-2''-sulfato), thalasiolina B (crisoeriol-7-O-β-D-glucopiranosil-2''-sulfato), thalasiolina C (apigenina-7-O-β-D-glucopiranosil-2''-sulfato), luteolina-3'-sulfato, crisoeriol-7-O-β-D-glucopiranosido, apigenina-7-O-β-D-glucopiranosido, dihidroxi-3',4'-dimetoxiflavona-7-O-β-D-glucopiranosido, crisoeriol y apigenina (Llanio et al. 2006; Rodeiro et al. 2008; Regalado et al. 2009, 2011,2012).

Los compuestos thalasiolina A-C son una familia de flavonas glicosiladas que han demostrado tener actividad contra el VIH al actuar sobre la integrasa del virus; estudios in vitro demostraron que la molécula más activa de esta familia es la thalasiolina A, pues inhibe las reacciones catalizadas por la integrasa del VIH purificada y mostró una protección antiviral significativa contra el VIH en cultivos celulares (Rowley et al. 2002).

Thalasiolina B es el compuesto más abundante en el extracto BM-21, en su estructura está presente una aglicona (crisoeriol) y un azúcar sulfatado, su aplicación tópica reduce de forma importante los daños en la piel causados por rayos UV mediante la captura del radical 2,2-difenil-2-picrilhidracil. Adicionalmente se ha reportado que produce anti-nocicepción en la prueba de formalina en ratas, así como una inhibición en las corrientes ASICs presentes en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal, por lo cual se ha sugerido que los efectos antinociceptivos

thalasiolina B están relacionado con los canales ASIC (Regalado et al., 2009, Garateix et al., 2011).

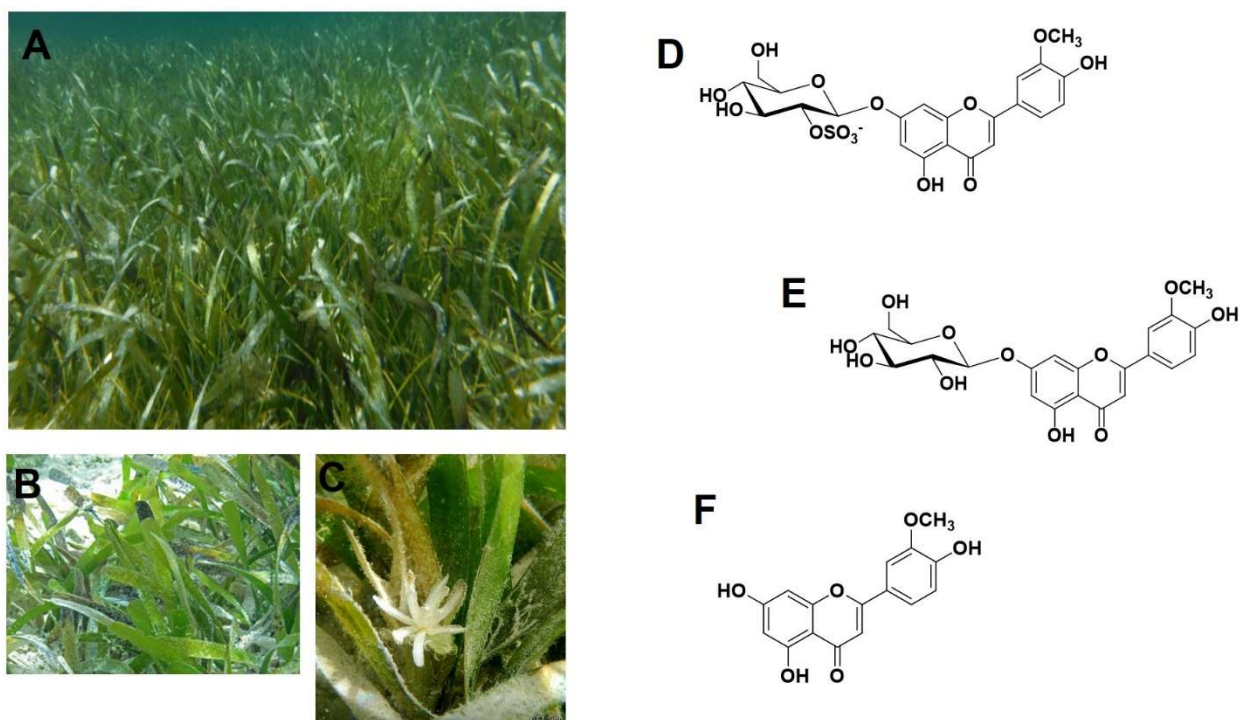


Figura 7. *Thalassia testudinum* y sus derivados. A. Pradera formada por *Thalassia testudinum*. Usualmente suelen formarse en zonas fangosas o arenosas poco profundas. **B. Hojas.** Tienen forma lineal y son rectas como cintas, tienen puntas redondeadas y alcanzan una longitud de hasta 30cm. **C. Flor.** Son de color blanco verdoso y crecen en los tallos cortos. Estructura química de los tres compuestos derivados del extracto BM-21, **D.** crisoeriol-7-O-β-D-glucopiranosil-2"-sulfato (thalasiolina B), **E.** crisoeriol-7-O-β-D-glucopiranosido, **F.** Crisoeriol. Imágenes tomadas de Short, F. T.; Carruthers, T. J. R.; van Tussenbroek, B.; Zieman, J. (2010). «*Thalassia testudinum*». IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2 y "Hierba de Tortuga" (*Thalassia testudinum*), pastomarina.wordpress.com

Otro de los componentes que llaman la atención en el extracto BM-21 es el crisoeriol, un flavonoide que pertenece al grupo de las flavonas y que tiene efecto antiobesidad, antioxidante y antiinflamatorio, inhibe la peroxidación lipídica de lipoproteínas de baja densidad y captura radicales libres. Adicionalmente, experimentos *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el crisoeriol tiene actividad antimutagénica y antitumoral (Choi et al. 2005; Han et al 2003; Mishra et al. 2003; Yang et al. 2010; Takemura 2010; Zeng 2016).

Justificación

La creciente importancia de los ASICs tanto en procesos fisiológicos como patológicos hace relevante encontrar moléculas que modulen su actividad. A partir del pasto marino *Thalassia testudinum* se ha obtenido el extracto BM-21, en el cual se encuentran 3 compuestos análogos de naturaleza fenólica (thalasiolina B, crisoeriol-7-O- β -D-glucopiranosido y crisoeriol), los cuales difieren entre sí únicamente por la presencia de un azúcar (crisoeriol-7-O- β -D-glucopiranosido) o un grupo sulfato unido con un azúcar (thalasiolina B) en la posición C-7 de la aglicona. El uso de compuestos análogos permite discernir si el efecto observado es o no dependiente de la estructura. Trabajos recientes en nuestro laboratorio han demostrado que tanto el extracto marino BM-21 como la thalasiolina B (crisoeriol-7-O- β -D-glucopiranosil-2"-sulfato) inhiben las corrientes ASIC (presentes en neuronas del ganglio de la raíz dorsal de la rata) con desensibilización rápida ($t < 400$ ms), con una acción no significativa sobre corrientes ASIC con cursos temporales de desensibilización más lentos ($t > 400$ ms), lo cual indica que su efecto podría ser específico para una subunidad.

Hipótesis

Los flavonoides derivados del extracto BM-21, obtenido del pasto marino *Thalassia testudinum* contiene compuestos relacionados con la thalasiolina B que actúan sobre canales homoméricos ASIC inhibiendo su conductancia.

Objetivos

- General:
 - Caracterizar el efecto y mecanismo de acción de los flavonoides crisoeriol-7-O- β -D-glucopiranosil-2''-sulfato (thalasiolina B), crisoeriol-7-O- β -D-glucopiranosido y crisoeriol sobre canales ASIC formados por subunidades específicas expresadas en un sistema heterólogo (células de ovario de hámster chino, CHO).

- Específicos:
 - Determinar el efecto de thalasiolina B, crisoeriol-7-O- β -D-glucopiranosido y crisoeriol en canales ASIC formados por subunidades específicas expresados en células CHO, estudiando el efecto de su pre-, co-aplicación y aplicación sostenida sobre la amplitud y la cinética de desensibilización de las corrientes registradas.
 - Construir las curvas concentración-efecto correspondientes y determinar las potencias relativas de los compuestos en estudio.
 - Determinar si el efecto de estos compuestos es dependiente del pH.
 - Determinar si el efecto es modificado por la desensibilización de estado estacionario de la corriente ASIC.
 - Con base en nuestros experimentos, proponer una explicación que dé cuenta del mecanismo de acción de las sustancias estudiadas.
 - Obtener información que sirva como base para futuros estudios sobre la relación estructura-actividad de esta familia de flavonas. En particular, investigar si el grupo sulfato en la posición C-2'' de la glucosa, y la azúcar en la posición C-7 de la aglicona, están relacionados con el efecto observado sobre los canales ASIC.

MATERIAL Y MÉTODOS

Producción de los plásmidos ASIC.

Los DNAC para ASICs fueron donados por el Dr. Stefan Gründer de la Universidad de Aachen, Alemania y el Dr. Michel Welsh de la universidad de Iowa, Estados Unidos. ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a y ASIC3 fueron subclonados en el vector de expresión de mamífero pNS1z (NeuroSearch), un vector derivado de pcDNA3 (InVitrogen) donde la expresión del inserto está bajo control del promotor del citomegalovirus. Los DNAC se mantuvieron y amplificaron en *E. coli*. Todos los plásmidos se purificarán empleando el kit QUIAGEN Plasmid Plus Maxi Kit (QUIAGEN), según las instrucciones del fabricante. Esta parte del trabajo se realizó en colaboración con el Dr. Ricardo Félix del CINVESTAV.

Expresión de canales ASIC en un sistema heterólogo (Células CHO K-1).

Todos los constructos se expresaron en células CHO-K1 (ATCC No. CCL61). Las células fueron sembradas en cajas de cultivo en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) enriquecido con 10 mM HEPES, 2 mM glutamina, 10% de suero fetal bovino, 2 mM piruvato and antibiótico-antimicótico. Se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de aire con 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa y se realizaron dos pases por semana.

24 horas antes de la transfección se sembraron células CHO-K1 en cajas de Petri que contenían vidrios pre-tratados y recubiertos con Poli-D-lisina para obtener una confluencia celular de alrededor del 50 al 60% en cada vidrio. Las células CHO-K1 fueron transfectadas con las clonas de las distintas subunidades de los canales ASICs y se incluyó el gen reportero pGreen Lantern-1 para identificar las células transfectadas. La transfección se realizó por medio del método de lipofección utilizando los reactivos del paquete comercial Lipofectamine Plus (Gibco/BRL). Para lo cual, en un eppendorf estéril se colocaron 100 µL de DMEM sin suplementar, los plásmidos correspondientes a las subunidades ASICs, el plásmido para la proteína

fluorescente verde y el reactivo plus. En un segundo eppendorf se colocaron 100 μ L de DMEM sin suplementar y 6.6 μ L de lipofectamina. Los tubos se agitaron suavemente y se mantuvieron incubando a temperatura ambiente durante 15 min. Posterior a este tiempo, el contenido de ambos tubos se mezcló y se incubó por 30 min a temperatura ambiente para permitir que los liposomas incorporaran el ADN. El medio de cultivo de las células sembradas se recambió por medio DMEM sin suero (1 mL) y se añadieron los complejos de transfección mezclando suavemente por rotación para permitir que los complejos se distribuyeran uniformemente en la caja de cultivo. Las células transfectadas se incubaron a 37°C, 5% CO₂ por 3 horas posteriormente el medio de cultivo se completó con medio suplementado a un volumen final de 2 mL y después de 24 hr se recambió por DMEM suplementado fresco.

Cultivo de neuronas del ganglio de la raíz dorsal.

Para realizar los registros en neuronas provenientes de los GRD se emplearán ratas Long Evans de 7-10 días de edad postnatal, sin distinción de sexo, obtenidas del bioterio "Claude Bernard" de esta universidad. Tras ser anestesiadas con sevoflurano, se procedió a su decapitación, para después abrir la columna vertebral, remover la médula espinal y disecar los ganglios de la raíz dorsal, torácicos y lumbares, colocándolos en medio de cultivo Leibovitz L-15 (Invitrogen) para su posterior cultivo. Las neuronas provenientes de estos ganglios fueron cultivadas como se ha descrito previamente (Garza et al., 2010; Garateix et al., 2011) este procedimiento se realizó en un cuarto de cultivo, en el que se cuenta con una campana de flujo laminar (Nuaire) y una incubadora con control de temperatura y CO₂ (Nuaire). Cabe señalar que todo el material que se empleó en el procedimiento y que no fue estéril o susceptible de esterilizar en la autoclave, fue esterilizado mediante su exposición a luz ultravioleta.

Una vez obtenidos todos los ganglios, estos se colocaron en un tubo estéril con 2 ml de solución compuesta por colagenasa y tripsina (1.25 mg/ml cada una, ambas

de Sigma-Aldrich) en medio L-15. El tubo con los ganglios se incubó a 37°C durante 30 minutos, pasado ese tiempo el medio de cultivo con las enzimas fue remplazado por medio L-15 y se llevó a cabo una disociación mecánica con ayuda de pipetas Pasteur pulidas a fuego. Al término de la disociación se centrifugó por 5 minutos, lavando después con medio L-15 fresco; esto se repitió 3 veces. Luego del último lavado se eliminó el sobrenadante y la suspensión que contenía a las células se colocó en una caja para cultivo que con cubreobjetos recubiertos previamente con poli-D-lisina. Las neuronas se mantuvieron en cultivo durante 8 horas en medio L-15 modificado con la siguiente composición: suero bovino fetal (al 10%), penicilina (500 UI), fungizone (2.5 µl/ml), NaHCO₃ (15.7 mM) y HEPES (15.8 mM).

Registro electrofisiológico

Los registros de fijación de voltaje se realizaron 48 hrs posteriores a la transfección. Todos los registros se realizaron utilizando un amplificador Axopatch-1D (Molecular Devices). Los microelectrodos (1-2.5 MΩ) fueron elaborados a partir de capilares de vidrio de borosilicato con un estirador de micropipetas Sutter P-2000. Los registros de fijación de voltaje en la configuración de célula completa se realizaron en una cámara de registro perfundida con una solución Ringer normal (pH 7.4) a temperatura ambiente (22-25° C). Las soluciones extracelulares fueron impulsadas por gravedad utilizando un sistema de perfusión de 3 tubos cuadrados colocados en la proximidad de las células. Los cambios de solución (< 100 ms) se realizaron por medio de un sistema SB-77 de perfusión controlado por computadora (Warner Instruments). El control experimental y el registro de las corrientes se efectuaron usando el programa Pclamp 9 (Molecular Devices.). Las corrientes provocadas por ácido fueron generadas al perfundir la célula con solución ácida durante 5 segundos. Para construir la curva de magnitud de la corriente en función del pH el protocolo fue semejante, pero para la solución extracelular utilizamos pHs en un rango de 4 a 8.0. Para estudiar el efecto de los flavonoides sobre la desensibilización de estado estable se aplicó un prepulso de pH en un rango entre 7 y 8 seguido del pulso de prueba ácido.

Los registros se capturaron usando un convertidor analógico digital (Digidata 1200) con el software pClamp 9. El voltaje de membrana se mantuvo en -60 mV. La capacitancia y la resistencia en serie se compensaron electrónicamente. La resistencia en serie fue compensada al 80%. Las soluciones empleadas fueron: a) extracelular (en mM): KCl 5.4, NaCl 140, MgCl₂ 2, CaCl₂ 1.8, HEPES o MES 10, Glucosa 10, ajustada al pH con NaOH. Para aquellas soluciones cuyo pH fue 6.1 o inferior se utilizó MES en vez de HEPES como amortiguador; b) intracelular (en mM): KCl 125, NaCl 10, CaCl₂ 0.1, HEPES 10, EGTA 10, GTPNa 1, ATPMg 2 (pH 7.2 ajustado con KOH).

Análisis de datos

Los datos se analizaron fuera de línea con el programa Clampfit 9.2 (Molecular Devices). Cada condición experimental se realizó varias veces para cada célula, promediando los valores obtenidos. En cada caso, se realizó un registro control y uno de lavado. Las corrientes obtenidas fueron normalizadas con respecto a su corriente control. Las curvas concentración-efecto de pH y flavonoide se ajustaron empleando la función:

$$Y = \frac{I_{min} + (I_{max} - I_{min})}{(1 + (X/CE_{50})^H)}$$

Donde:

Y = es el efecto farmacológico de la sustancia probada (H⁺ o thalasiolina)

X= la concentración del fármaco (H⁺ o thalasiolina)

I_{max} y I_{min} = son el máximo y mínimo del efecto sobre la corriente ASIC

CE₅₀ = es la concentración a la que se observa el 50% del efecto sobre la corriente entre ambos límites

H = es la constante de Hill.

Para comparar datos del efecto contra su control en la misma célula se empleó la prueba t de Student pareada, mientras que para comparar el efecto entre los protocolos de aplicación y los diferentes flavonoides se empleó la prueba ANOVA de una vía.

Las corrientes obtenidas fueron analizadas con base en los siguientes parámetros:

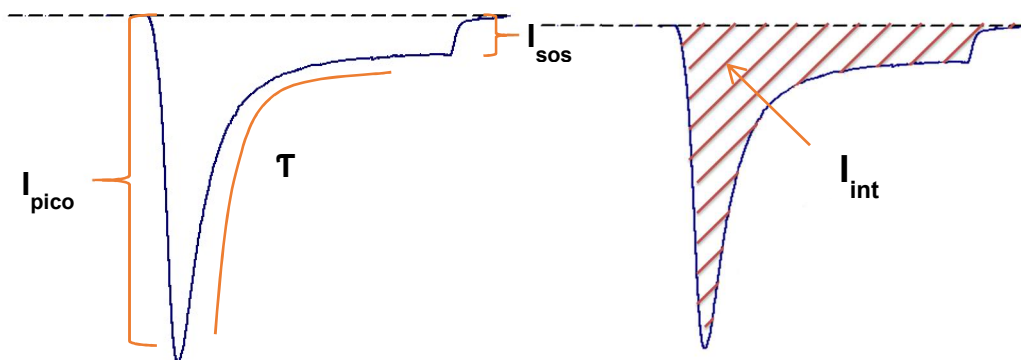
I_{pico} = Es la amplitud máxima de corriente o pico de corriente; ésta se observa al inicio del estímulo ácido.

I_{sos} = La amplitud de la corriente al final del pulso de pH ácido.

T_{50} = El tiempo que tarda la corriente en decaer al 50% de su valor máximo durante la desensibilización.

T_{des} = Constante de tiempo de la desensibilización (podría requerirse más de una sola exponencial).

$I_{\text{sos}}/I_{\text{pico}}$ = La relación entre amplitud de la corriente al final del pulso y la amplitud máxima de corriente al pico.



Análisis in silico

Para contribuir a definir el mecanismo de acción de los flavonoides derivados de *T. Testudinum* se realizó un análisis in-silico de su interacción con los canales ASIC. Estos análisis se realizaron con el canal homomérico mutante ASIC1a (de pollo). La información de la estructura cristalizada de las proteínas se obtuvo de la base de datos *Protein data bank* (URL: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), y tienen como código identificador PDB: 4NYK (González et al, 2009) y PDB: 4NTW (Baconguis et al, 2014), respectivamente.

El programa utilizado para la realización del anclaje fue AutoDock Vina 4.2 (Trott y Olson, 2010) y los resultados se visualizaron en Chimera 1.8.1. El programa permitió realizar anclaje de tipo “flexible”. Se realizaron distintos anclajes en mapas de interacción del canal ASIC con base en un mapa de energías de interacción. Para el caso del canal en estado abierto, se trabajó con el cristal 4NTW; el cual es un complejo del canal ASIC1a con la toxina peptídica MitTx (misma que hace que se mantenga el canal en dicho estado). La estructura cristalográfica ensamblada fue obtenida del sistema pdbePISA de EMBL-EBI. (URL=http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/cgi-bin/piserver). El canal ASIC1a de 4NTW cuenta con errores estructurales que provienen del mismo cristal; pues, algunos aminoácidos no están bien establecidos (V45, R85, D127, E133, K134, T294, G296, E299, D302, E358, V427, I446, Y455, A456 de cada subunidad).

RESULTADOS

Subunidades ASIC expresadas en células CHO

Para este trabajo empleamos la técnica de transfección con lipofectamina con el fin de transfectar en células CHO-K1 los distintos cDNAs que codifican para cada una de las subunidades ASIC, una vez obtenidas células CHO-K1 que expresaban canales ASICs homoméricos funcionales se procedió a caracterizar las corrientes de cada subunidad ASIC obteniendo sus respectivas curvas de dependencia a pH y posteriormente se caracterizó el efecto de los compuestos derivados de *T. testudinum* sobre ellas, para lo cual se registraron un total de 273 células mediante la técnica de fijación de voltaje en la configuración de célula completa de las cuales. Para activar las corrientes ASICs, las células CHO fueron expuestas de manera transitoria a medios ácidos aplicados extracelularmente. Los compuestos a probar, así como las soluciones con diferentes pHs se aplicaron en la solución de baño empleando un sistema de perfusión móvil con salidas múltiples (cambio de salida ~ 20 ms). Las diferentes corrientes homoméricas expresadas en células CHO K-1 mostraron una heterogeneidad en cuanto al tamaño de la corriente al pico, capacitancia y sobre los indicadores de la desensibilización de la corriente (Tabla 4). Con respecto a la normalidad relacionada con la capacitancia de las células que expresaban las distintas subunidades ASIC, encontramos que únicamente las subunidades ASIC1b y 3 tienen una distribución normal (prueba de normalidad Shapiro-Wilk).

Parámetros de las corrientes ASICs				
	ASIC1a	ASIC1b	ASIC2a	ASIC3
Capacitancia (pF)	20.8 ± 1.1	24.8 ± 1.2	17.7 ± 0.8	17.05 ± 0.9
I _{pico} (nA)	-2.0 ± 0.2	-1.6 ± 0.02	-4.1 ± 0.3	-1.0 ± 0.1
I _{sos} (nA)	-0.05 ± 0.01	--	-0.85 ± 0.12	-0.03 ± 0.003
T ₅₀ (s)	0.5 ± 0.04	0.69 ± 0.03	1.3 ± 0.07	0.29 ± 0.016
T _{des} (ms)	513.5 ± 34.5	624.7 ± 31.7	1061.6 ± 29.7	301.9 ± 12
I _{sos} /I _{pico}	0.023 ± 0.003	0.111 ± 0.01	0.191 ± 0.01	0.044 ± 0.006
n	76	57	100	40

Tabla 4. Parámetros de las corrientes ASIC expresadas en células CHO-K1.

Se sabe que los homómeros ASIC tienen diferente grado de sensibilidad a la concentración de protones, debido a eso realizamos curvas de sensibilidad pH para cada uno de los canales homoméricos ASIC, obteniendo con ello valores de pH_{50} (pH al cual se obtiene el 50% de la corriente máxima) para cada subunidad ASIC (ASIC1a = 5.75, ASIC1b = 6.28, ASIC2a = 4.45, ASIC3 = 6.5) (Fig. 8) que coinciden con lo reportado en la literatura (Hessselager et al. 2004). Todos los experimentos subsecuentes se realizaron activando a las corrientes ASICs con un pH cercano al pH_{50} de su respectiva subunidad (1a = 5.5, 1b = 6.1, 2a = 4.5, 3 = 6.5).

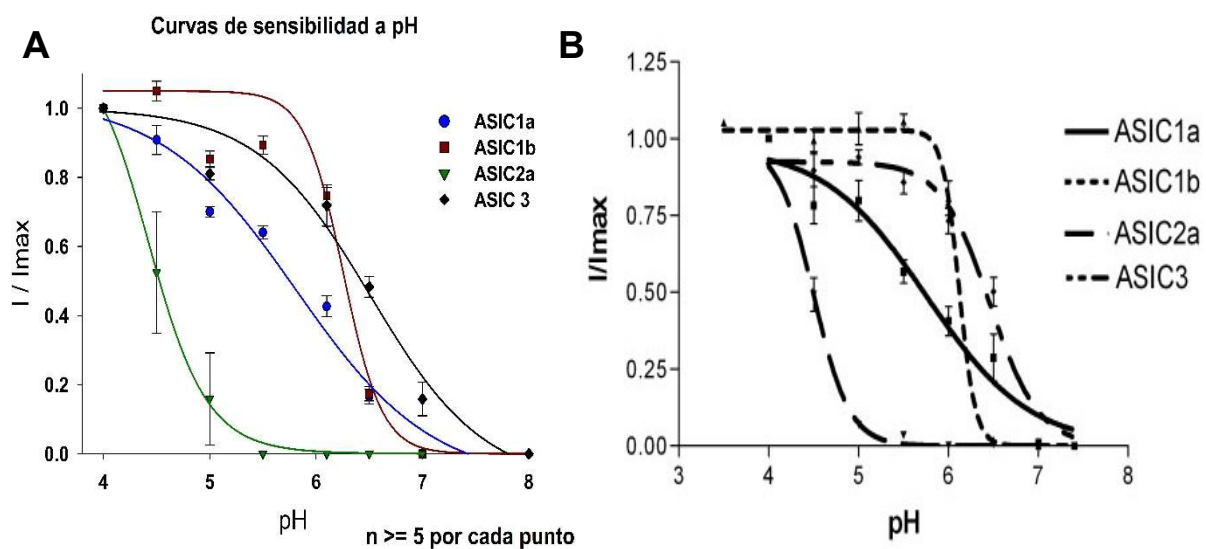


Figura 8. Dependencia de pH para las diferentes subunidades ASIC. **A.** se muestran las curvas de dependencia a pH para cada una de las subunidades ASIC realizadas en nuestro laboratorio, se obtuvieron los siguientes pH_{50} : ASIC1a = 5.75, ASIC1b = 6.28, ASIC2a = 4.45 y ASIC3 = 6.5, la subunidad ASIC3 fue la más sensible a los cambios de pH. **B.** Curvas de dependencia a pH para las subunidades ASICs obtenidas por Hessselager y colaboradores en el 2004, reportan los siguientes pH_{50} : ASIC1a = 5.8, ASIC1b = 6.1, ASIC2a = 4.5, ASIC3 = 6.4. Modificada de Hessselager et al. 2004.

Efecto de crisoeriol 7-O-β-D-glucopiranosido sobre homómeros ASIC

Crisoeriol 7-O-β-D-glucopiranosido (un compuesto estructuralmente formado por un azúcar unido a la aglicona crisoeriol en la posición C7) fue el menos efectivo de los compuestos probados, a concentraciones de 100 μ M afecto reversiblemente a los homómeros ASIC1a inhibiendo la corriente al pico (13%), sin modificar ninguno de

los otros parámetros de la corriente durante la co-aplicación (Fig. 9), mientras que empleando los otros dos protocolos no se observó ningún efecto significativo. Este compuesto mostro ser incapaz de producir inhibición en ninguna otra subunidad ASIC (1b, 2a y 3) e incluso a concentraciones altas (300 μM) el efecto inhibitorio fue únicamente de ($16 \pm 3 \%$) sobre la I_{pico} de ASIC1a durante el protocolo de co-aplicación (datos no mostrados con $n = 5$).

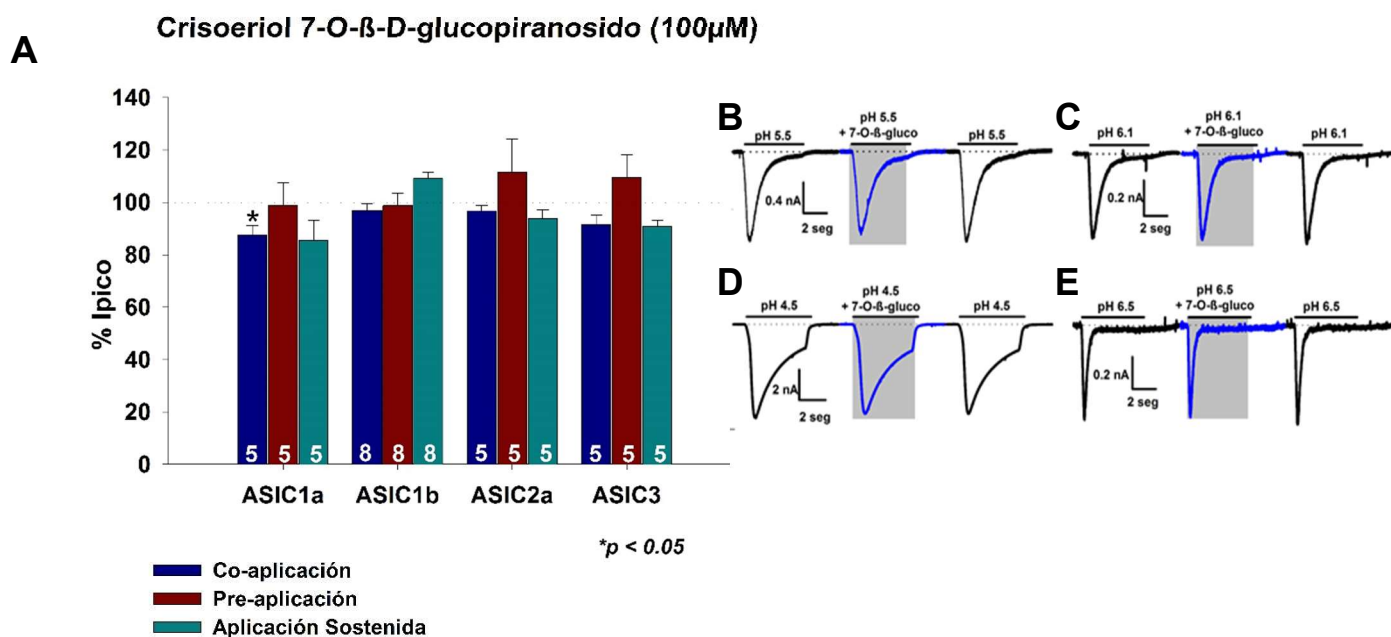


Fig. 9. Efecto de criseoriol 7-O- β -D-glucopiranosido sobre homómeros ASIC. **A.** El único efecto significativo se observa sobre la subunidad ASIC1a bajo el protocolo de co-aplicación, las demás subunidades no se ven afectadas. **B.** Corrientes representativas del efecto de criseoriol 7-O- β -D-glucopiranosido sobre homómeros ASIC1a en co-aplicación. **C.** Homómeros ASIC1b en protocolo de co-aplicación, no se observa efecto significativo. **D.** Homómeros ASIC 2a. **E.** Homómeros ASIC3.

Efecto de Thalasiolina B (ThB) sobre homómeros ASIC

Thalasiolina B, el compuesto más abundante en el extracto BM-21 obtenido de *Thalassia testudinum* no tuvo efecto significativo en las corrientes homoméricas ASIC3, pero en cambio se pudieron observar efectos inhibitorios sobre las corrientes producidas por subunidades ASIC1a y ASIC2a. En ASIC1a la co-aplicación de thalasiolina B produjo un efecto inhibitorio de $18 \pm 4\%$ sobre la corriente al pico sin

alterar los demás parámetros de la corriente, mientras que en la subunidad ASIC2a la inhibición sobre la corriente al pico se observó con la co-aplicación y aplicación sostenida (18 ± 2 y $17 \pm 2\%$ respectivamente) (Figura 10).

La subunidad ASIC1b requiere una mención especial, pues aunque durante la co- y pre-aplicación thalasiolina B no tuvo efecto sobre la corriente al pico en esta subunidad, durante la aplicación sostenida se produjo un incremento significativo de la corriente al pico, el cual fue de 18% (Figura 11).

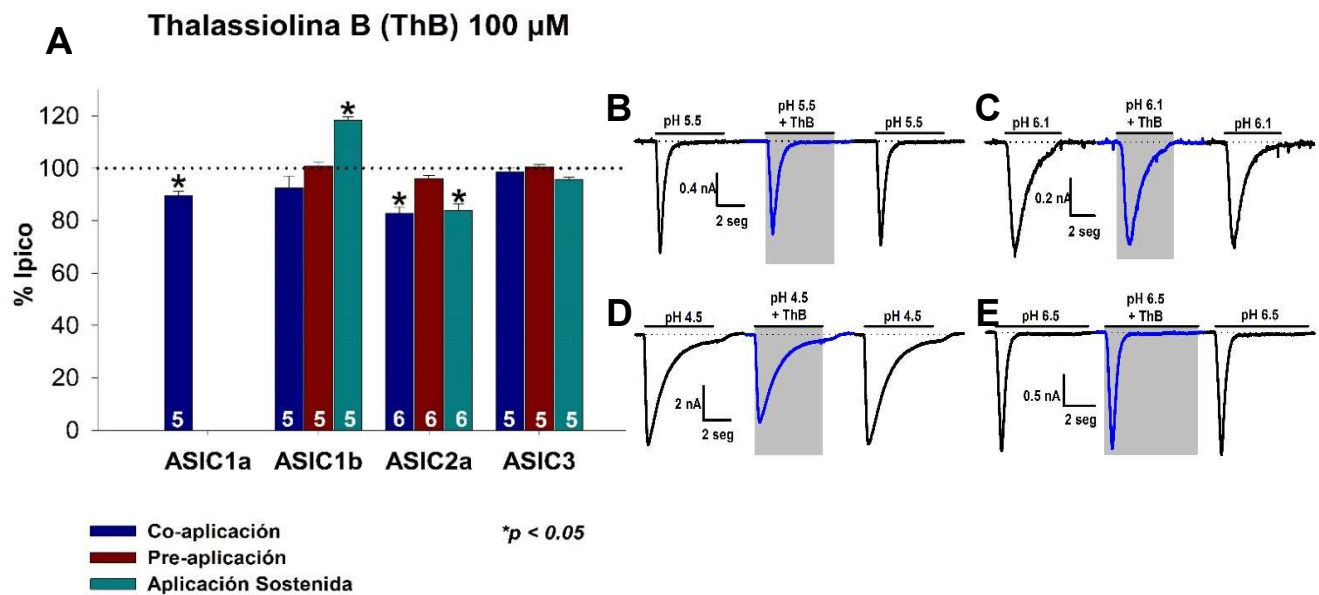


Fig. 10. Efecto de Thalasiolina B sobre homómeros ASIC. A. Se observa una disminución en co-aplicación en ASIC1a (12%) y ASIC2a (18%), mientras que para aplicación sostenida se produjo una disminución en las subunidades ASIC2a (17%) y ASIC3 (5%), así como un aumento significativo en el pico de la corriente ASIC1b de 18%. Corrientes ASICs de los homómeros 1a (B), 1b (C), 2a (D) y 3 (E) bajo el protocolo de co-aplicación.

La corriente producida por homómeros ASIC1b fue la única en la que se observó un efecto potenciador de la corriente al pico y la integral de la corriente (aplicación sostenida) producido por thalasiolina B a una concentración de 100 μ M (Fig. 11), en los demás parámetros de la corriente no hubo cambios significativos. Cabe señalar que todos los efectos producidos por ThB en las diferentes subunidades y modalidades de aplicación fueron completamente reversibles.

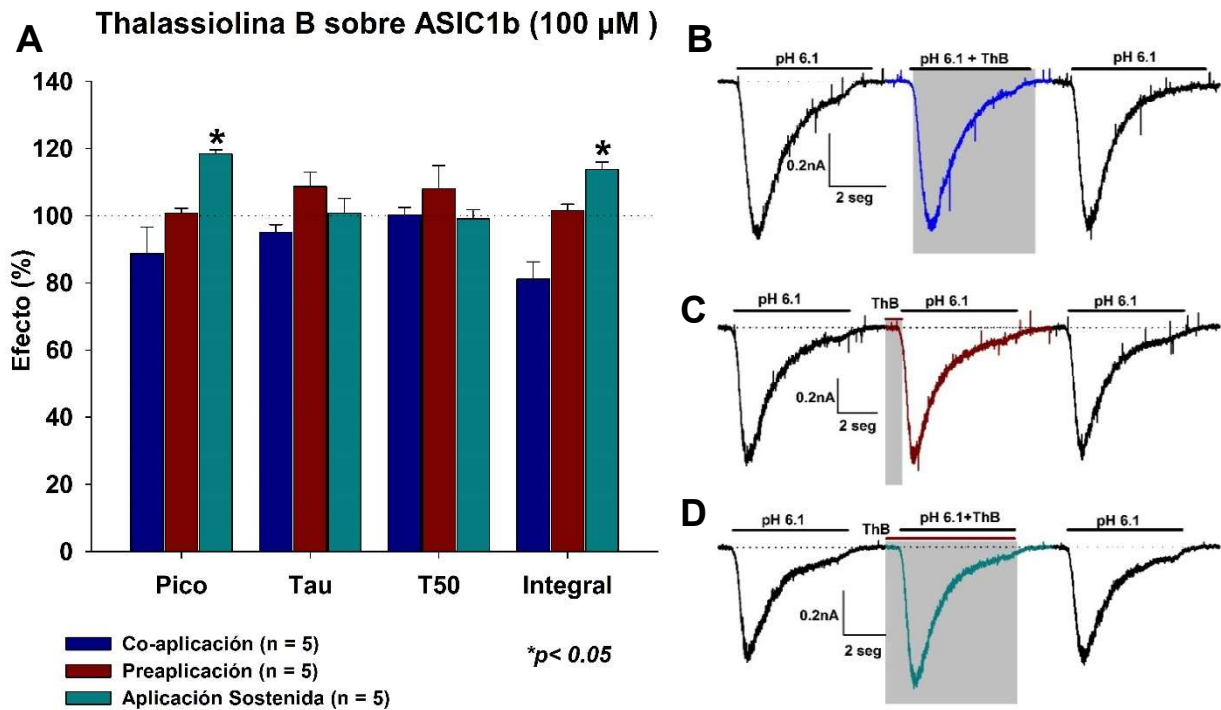


Fig. 11. Efecto de Thalassiolina B sobre ASIC1b. **A** Se observa un aumento estadísticamente significativo de la corriente al pico y la integral de la corriente en la aplicación sostenida (18% y 13% respectivamente), en otros protocolos no hay efectos significativos. **B.** Registro de corrientes homómeras ASIC1b en co-aplicación, **C.** pre-aplicación y **D.** aplicación sostenida con Thalassiolina B (100 μ M). ThB tiene un efecto potenciador con la aplicación sostenida, la corriente se recupera totalmente con el lavado.

Como mencionamos anteriormente, el efecto más pronunciado de thalassiolina B fue sobre ASIC2a, modificando la cinética de la corriente producida por estos homómeros al emplear dos de los tres protocolos de aplicación (co-aplicación y aplicación sostenida).

En la co-aplicación la corriente al pico y la integral disminuyeron $17 \pm 2\%$ y $20 \pm 2\%$ respectivamente. La aplicación sostenida produjo una inhibición que afectó a 3 de los 5 parámetros de la corriente. El parámetro menos afectado fue la T50 con una disminución de únicamente el $12 \pm 4\%$. Es importante mencionar que la tau, la cual está relacionada con la cinética de desensibilización del canal no se modificó ningún caso (Fig. 12).

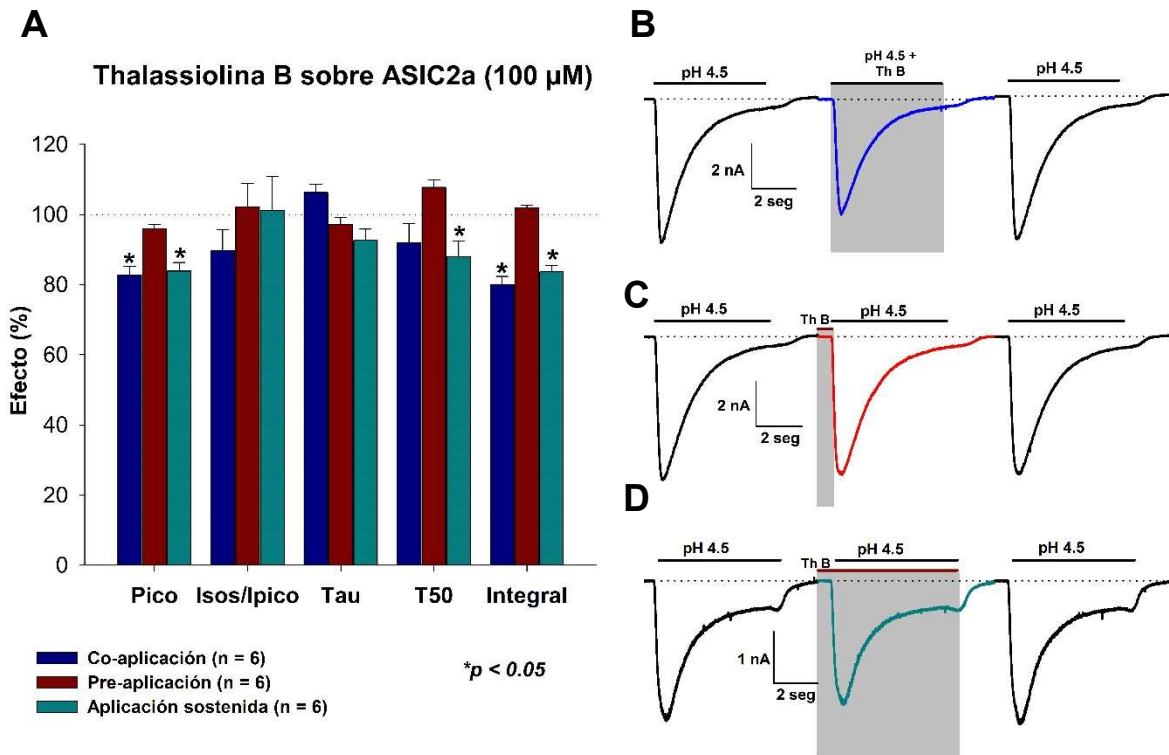


Figura 12. Efecto de Thalassiolina B sobre la corriente ASIC2a. **A.** Se observa una inhibición al pico similar con la co-aplicación y aplicación sostenida (17 y 18% respectivamente). El componente sostenido (Iss) fue más afectado durante la co-aplicación con una inhibición de 25% en comparación con un 15% con la aplicación sostenida. En cuanto a la integral se produjo una disminución similar entre los protocolos antes mencionados (17% y 21%). Finalmente el único parámetro que no mostró cambios fue la tau. Corrientes representativas de homómeros ASIC2a **B.** co-aplicación, **C.** pre-aplicación y **D.** aplicación sostenida, se grafica la corriente control, el efecto y su lavado.

Efecto de crisoeriol sobre las subunidades ASIC

A diferencia de los otros compuestos derivados de *T. testudinum*, el flavonoide crisoeriol tuvo un efecto mucho más robusto y consistente sobre todas las corrientes homoméricas ASIC. La subunidad en la cual crisoeriol (100 μ M) mostró tener una mayor actividad fue la 2a, pues produjo una inhibición sobre la Ipico de $72 \pm 2\%$ durante la aplicación sostenida, efecto que fue reversible en un $92 \pm 5\%$, mientras que la co-aplicación y la pre-aplicación produjeron una inhibición en la Ipico de $59 \pm 2\%$ y $34 \pm 6\%$ cada una, con recuperaciones de la corriente de $80 \pm 16\%$ y $97 \pm 1\%$ respectivamente. El efecto inhibitorio de la pre-aplicación de crisoeriol sobre la Ipico fue de $25 \pm 2\%$ para ASIC1a, $34 \pm 6\%$ para ASIC2a y $24 \pm 6\%$ para ASIC3, mientras

que en el caso de ASIC1b, crisoeriol no tuvo efecto significativo, todos los efectos obtenidos con este tipo de protocolo fueron completamente reversibles. La co-aplicación tuvo un efecto mayor, afectando a todas las subunidades ASICs, con máximo efecto en ASIC 2a al producir una inhibición del $59 \pm 2\%$ sobre la I_{pico} con una recuperación del $85 \pm 16\%$, mientras que la subunidad la menos afectada fue la 1a con una inhibición de solo el $17 \pm 2\%$ y recuperación de la corriente de $90 \pm 7\%$, para las subunidades ASIC1b y ASIC3 la inhibición fue de $36 \pm 4\%$ y $27 \pm 4\%$ sobre la I_{pico} y la recuperación fue de $80 \pm 1\%$ y 97 ± 1 respectivamente (Fig. 13).

La aplicación sostenida de crisoeriol inhibió la I_{pico} en todas las subunidades ASIC. La inhibición fue de $72 \pm 2\%$ para la subunidad ASIC2a con una recuperación de la corriente de $92 \pm 2\%$, mientras en ASIC1a la inhibición fue de $27 \pm 4\%$ y la recuperación de $58 \pm 2\%$. Los ASIC1b y 3 registraron una inhibición de la corriente al pico de $41 \pm 2\%$ y $35 \pm 4\%$ con una recuperación de la corriente de 92 ± 5 y $95 \pm 12\%$ respectivamente (Fig. 13).

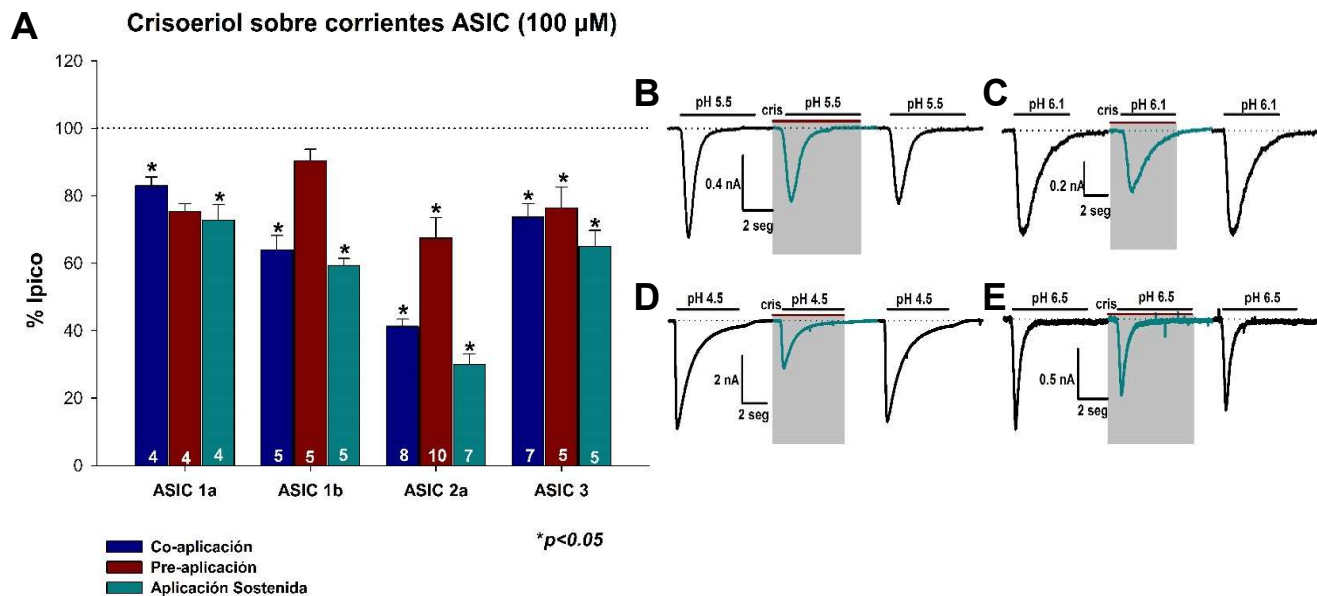


Figura 13. Efecto de crisoeriol sobre homómeros ASIC. **A.** La subunidad en la cual se observó un mayor efecto inhibitorio fue ASIC2a, mientras que la subunidad menos afectada por el flavonoide fue ASIC1a. Corrientes representativas del efecto de la aplicación sostenida de crisoeriol a una concentración de 100 μ M en las diferentes subunidades ASIC. **B.** ASIC1a, **C.** ASIC1b, **D.** ASIC2a, **E.** ASIC3.

Una de las subunidades más afectadas por el crisoeriol fue ASIC3, la cual se ha relacionado principalmente con procesos de nocicepción. La co y pre-aplicación de crisoeriol 100 μM sobre esta subunidad produjo una inhibición al pico de $27 \pm 4\%$ y $24 \pm 6\%$ respectivamente pero sin modificar ninguno de los demás parámetros de la corriente, estos efectos fueron totalmente reversibles. Para el caso de la aplicación sostenida encontramos que afecta otros parámetros tales como el componente sostenido y la integral. La disminución en de la relación del componente sostenido y la corriente al pico fue de $60 \pm 17\%$ mientras que la inhibición sobre la integral de la corriente fue de $40 \pm 10\%$ (Fig. 14).

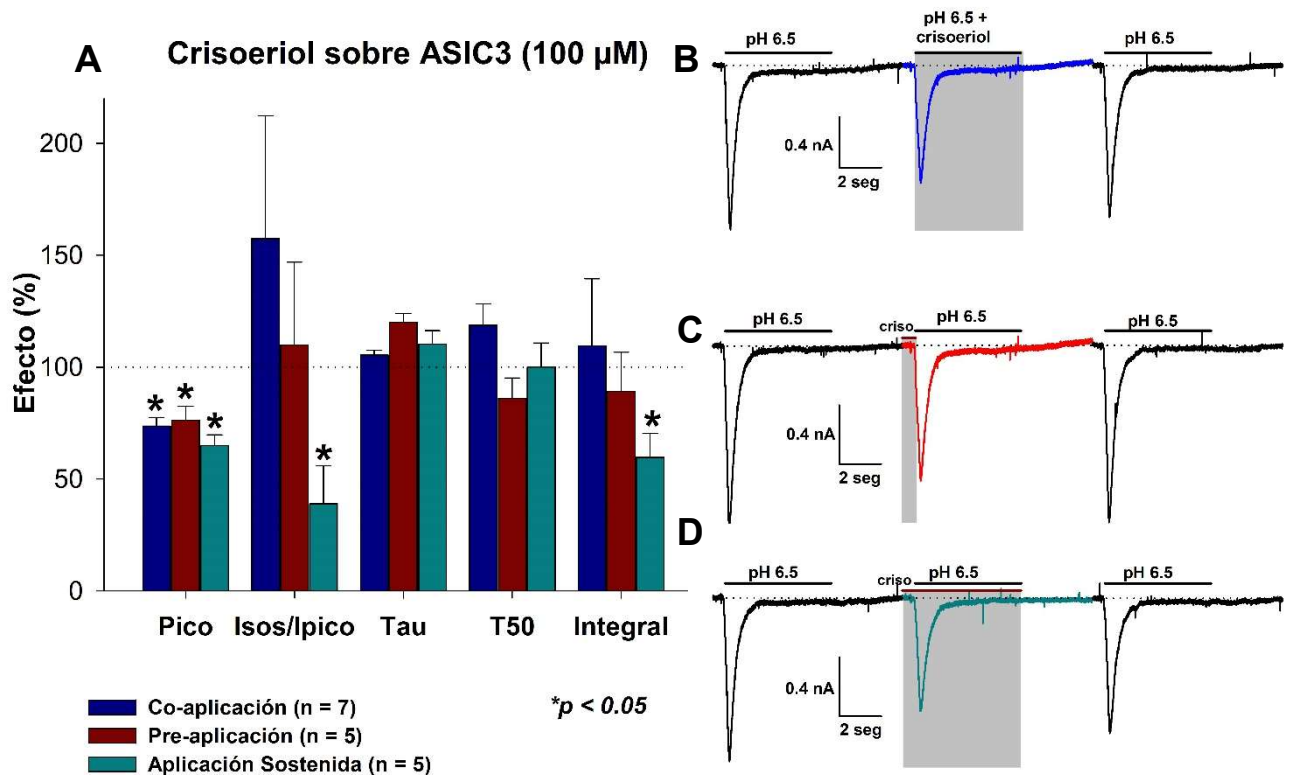


Fig. 14. Efecto de crisoeriol sobre ASIC3. **A.** Se observó una disminución sobre la corriente al pico, con todos los protocolos de aplicación, pero solo la aplicación sostenida produce un efecto inhibitorio sobre otros parámetros de la corriente (Iss e integral). Registros representativos de las corrientes homoméricas ASIC3 y el efecto de crisoeriol sobre ellas con diferentes protocolos de aplicación **B.** co-aplicación. **C.** pre-aplicación. **D.** aplicación sostenida.

Las corrientes producidas por homómeros ASIC2a son las más susceptibles al efecto de flavonoide crisoeriol. La pre-aplicación de crisoeriol 100 μ M provocó una inhibición completamente reversible en la I_{pico} y a integral de la corriente ASIC2a ($I_{pico} = 67 \pm 5\%$, integral = 69 ± 9), se observa un aumento en la relación entre la I_{sos} y la I_{pico} , lo cual nos indica que el componente sostenido no se modificó pero la I_{pico} disminuyó ($I_{sos}/I_{pico} = 130 \pm 5\%$), mientras que bajo el protocolo de aplicación sostenida los efectos inhibitorios se observaron en todos los parámetros de la corriente, sostenida produciendo una inhibición al pico de $72 \pm 2\%$, integral $75 \pm 1\%$ y componente sostenido $71 \pm 2\%$, mientras que para la tau y la T_{50} la inhibición producida por crisoeriol fue de $19 \pm 4\%$ y $28 \pm 7\%$ respectivamente (Fig. 14), cabe señalar que dichos efectos inhibitorios fueron totalmente reversibles.

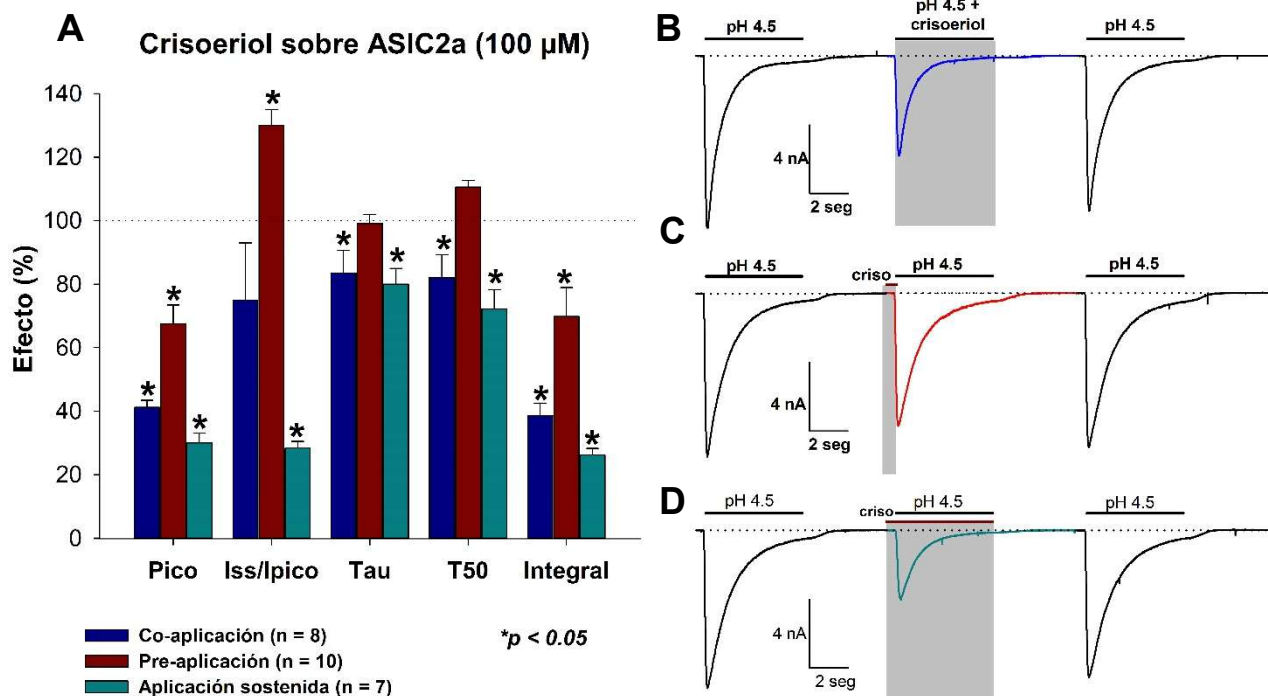


Figura 14. Efecto de crisoeriol sobre homómeros ASIC2a. A. Las corrientes producidas por homómeros ASIC2a fueron las más susceptibles al efecto de crisoeriol, la aplicación sostenida del flavonoide produjo una inhibición en todos los parámetros de la corriente. Trazos representativos de corrientes ASIC2a y el efecto que produce el flavonoide crisoeriol bajo los 3 protocolos de aplicación: B co-aplicación, C pre-aplicación y D aplicación sostenida.

Efecto de crisoeriol en las corrientes ASIC en nGRD

Las nGRD expresan todas las subunidades ASIC por lo que constituyen un modelo de relevancia para su estudio tanto por su papel en procesos sensoriales como por su accesibilidad. En las nGRD los ASICs conforman canales homo y heteroméricos (Álvarez de la Rosa et al., 2002) para los que en la rata se ha reportado ya un pH_{50} de 6.1 (Garza et al., 2010). Debido a que el efecto inhibitorio del crisoeriol fue similar en todos los homómeros ASIC decidimos probar su efecto sobre las nGRD empleando la concentración de 100 μM en los tres protocolos de aplicación. Encontramos que la pre-aplicación de crisoeriol no produce efecto significativo sobre la corriente ASIC, mientras que la co-aplicación y la aplicación sostenida producen una inhibición de la corriente al pico de $17 \pm 2\%$ y $44 \pm 10\%$, con una recuperación de la corriente de $80 \pm 5\%$ y $81 \pm 8\%$ respectivamente, sin afectar significativamente los demás parámetros de la corriente (Fig. 15).

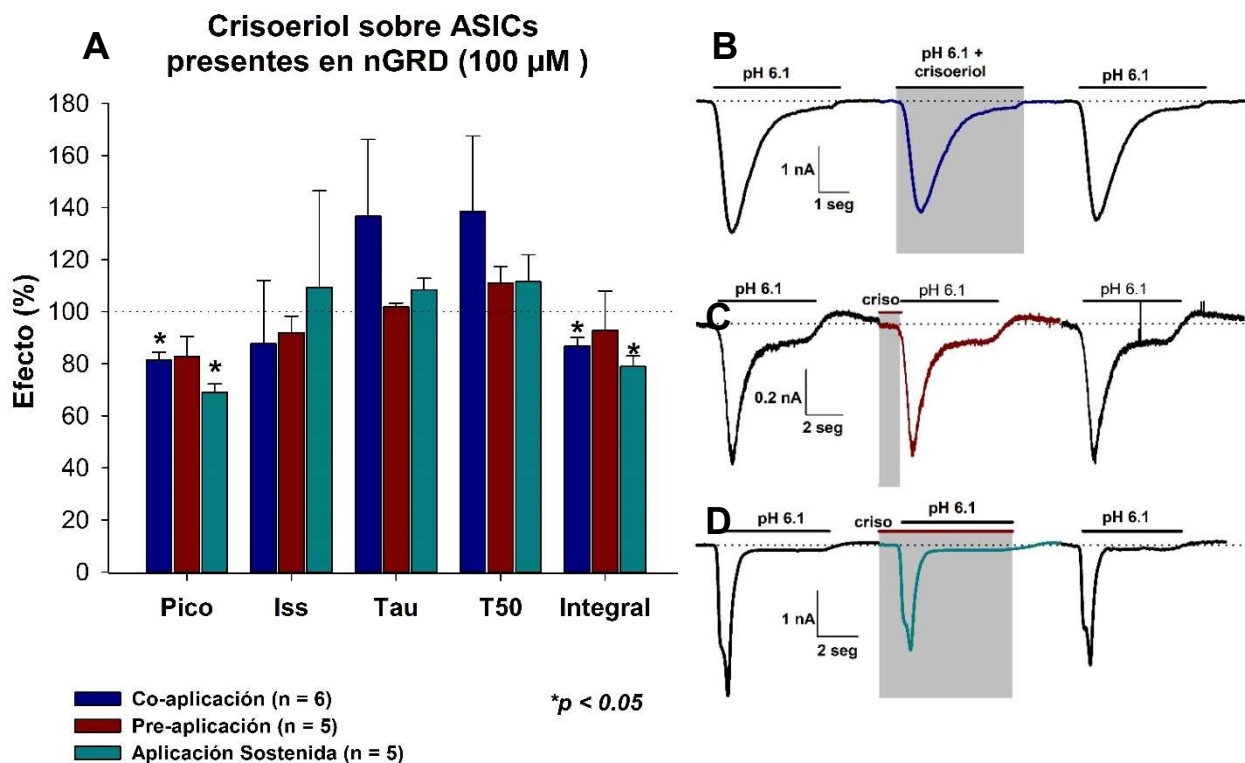


Figura 15. Efecto de crisoeriol sobre corrientes ASIC presentes en nGRD. A. El mayor efecto se observó en la aplicación sostenida, con este protocolo crisoeriol 100 μM inhibió el 32% de la I_{pico} y el 15% de la integral de la corriente. Trazos representativos de corrientes ASIC presentes en nGRD activadas con pH 6.1, así como el efecto producido por el flavonoide crisoeriol bajo los 3 protocolos de aplicación: (B) co-aplicación, (C) pre-aplicación, (D) aplicación sostenida.

Curvas dosis efecto de crisoeriol en ASIC2a

Se sabe que la subunidad ASIC2a es la menos sensible a los cambios de pH extracelular (pH_{50} 4.5) además de estar relacionada con procesos fisiológicos tales como la transducción visual, mecanosensación y el reflejo de los barorreceptores (Eittache et al., 2006; Price et al., 2001; Lu et al., 2009). En cuanto a procesos patológicos, ASIC2a se ha vinculado con la degeneración retinal, isquemia y migración de células tumorales.

Como se mencionó, la mayor inhibición producida por crisoeriol se observó en la subunidad ASIC2a, por lo cual realizamos curvas concentración efecto de este compuesto sobre dicha subunidad, con los tres protocolos de aplicación.

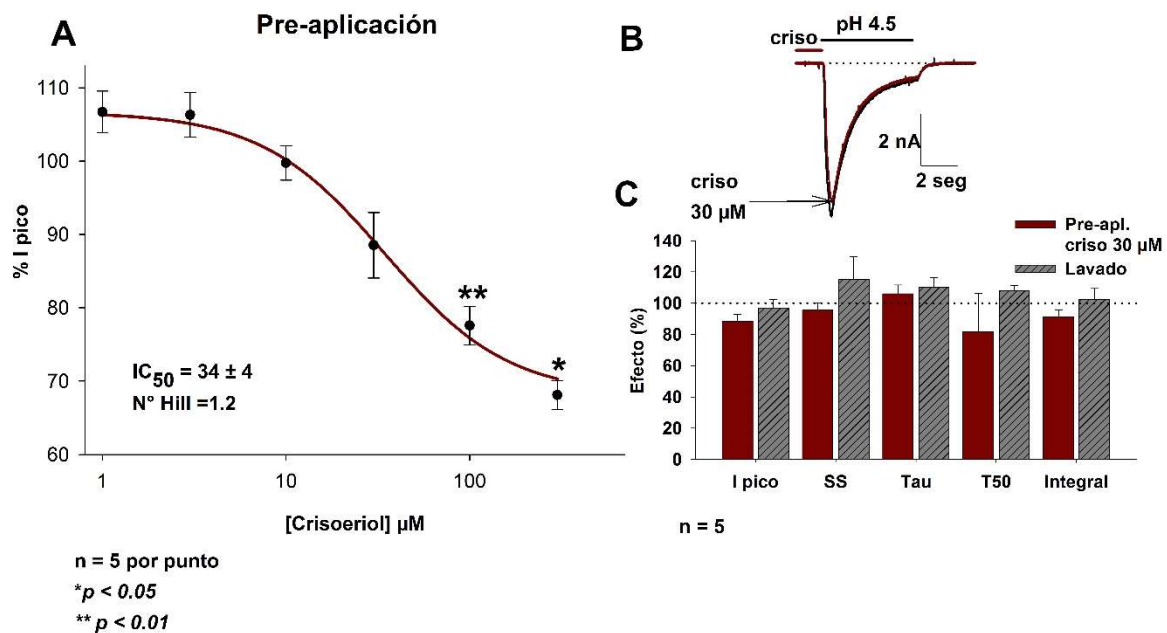


Figura 16. Curva D-E de crisoeriol durante pre-aplicación. **A.** En la pre-aplicación se encontró una IC_{50} de $34 \pm 4 \mu M$, el efecto inhibitorio fue significativo únicamente a partir de la concentración $100 \mu M$ y la máxima inhibición fue de 40% sobre la I_{pico} . **B.** Efecto de crisoeriol sobre la corriente ASIC2a bajo el protocolo de aplicación, la concentración coincide con la IC_{50} obtenida para este compuesto. **C.** El crisoeriol ($30 \mu M$) en este protocolo no modifica ningún parámetro de la corriente ASIC2a.

A altas concentraciones la pre-aplicación (el compuesto se encuentra interactuando con el canal en estado cerrado o inactivado) produjo un efecto inhibitorio máximo de 40% sobre la I_{pico} , sin afectar ninguno de los otros parámetros de la corriente ASIC2a. La curva dosis-efecto arrojó una IC_{50} de $43.4 \pm 4.4 \mu M$ para este compuesto durante la pre-aplicación con una inhibición máxima en la corriente al pico de 40% y número de Hill de 1.3 (Fig. 16).

En la co-aplicación (interacción del compuesto con regiones del canal ASIC expuestas en el estado abierto) altas concentraciones de crisoeriol ($300 \mu M$) lograron inhibir prácticamente el 100% de la corriente ASIC2a, modificando todos los parámetros de la corriente, se reporta una IC_{50} de $54 \pm 8 \mu M$ con un número de Hill de 1.4, bajo este protocolo de activación (Fig. 17).

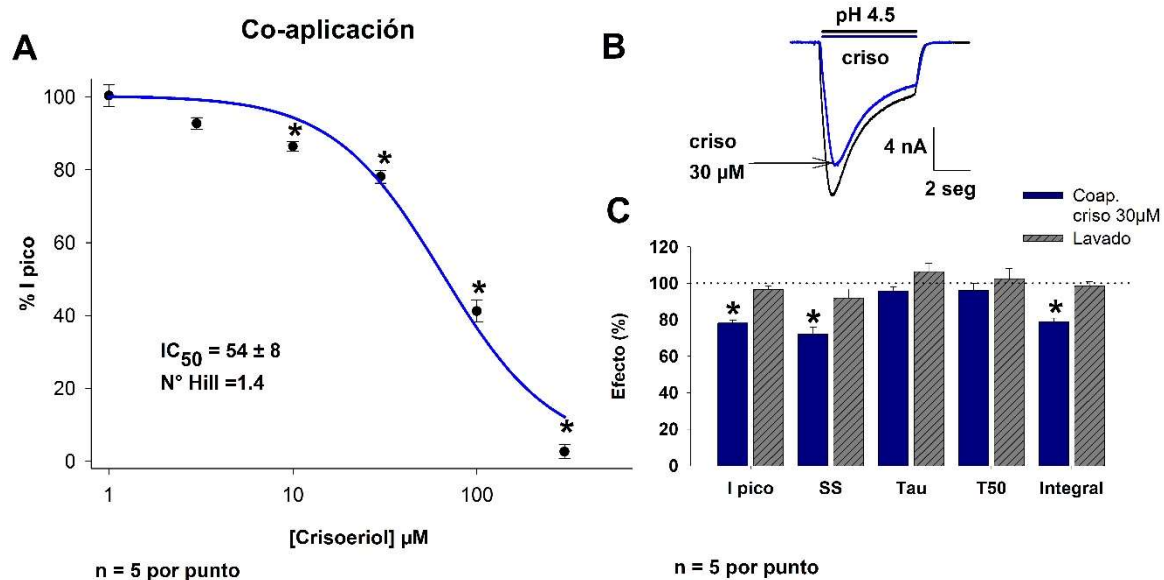


Figura 17. Curva D-E de crisoeriol en ASIC2a en co-aplicación. **A.** Se obtuvo una IC_{50} de $54 \pm 8 \mu M$, el efecto inhibitorio fue significativo a partir de $10 \mu M$ y a altas concentraciones se inhibió completamente la I_{pico} . **B.** Registro típico del efecto de crisoeriol para este compuesto durante la co-aplicación se observa una inhibición de la corriente al pico. **C.** Efecto de crisoeriol ($30 \mu M$) sobre los parámetros de la corriente ASIC2a, en co-aplicación no se modifica ningún parámetro de la corriente relacionado con la desensibilización del canal.

Finalmente durante la aplicación sostenida se logró obtener el mayor efecto inhibitorio, bajo este protocolo crisoeriol no solo disminuyó la corriente al pico, sino modificó otros parámetros de la corriente tales como la tau y el componente sostenido. Para la curva concentración contra efecto se obtuvo una IC₅₀ de 36 ± 6 μM y un número de Hill de 1.1. Empleando una concentración de 30 μM bajo este protocolo se logró producir una inhibición de todos los parámetros de la corriente ASIC2a, dicho efecto fue completamente reversible al retirar el compuesto (Fig.18).

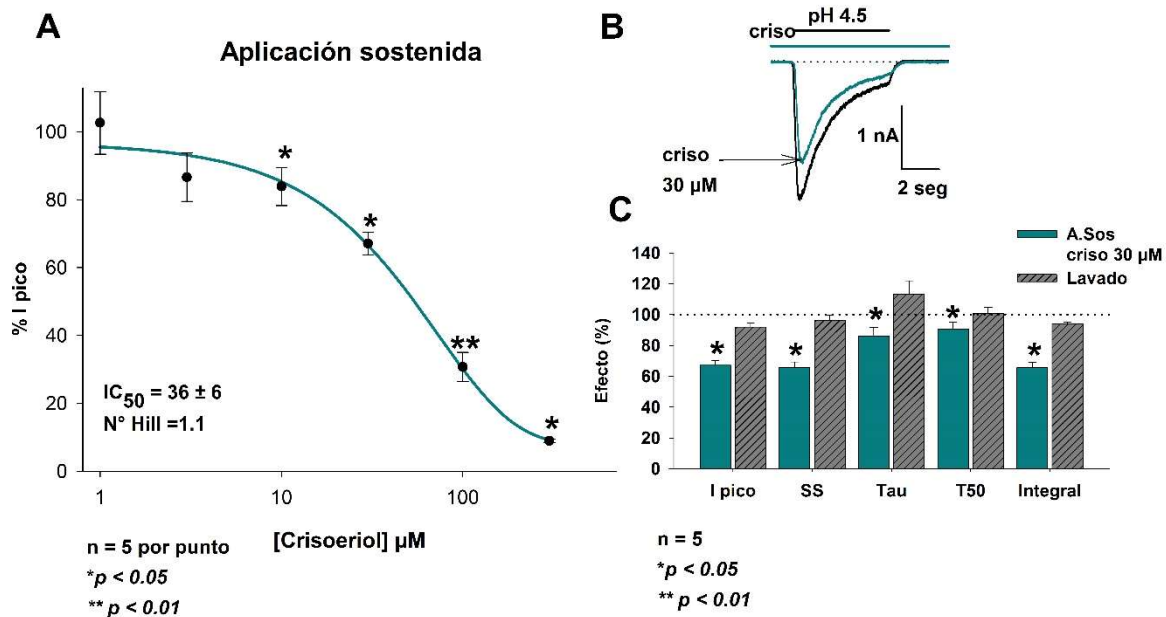


Figura 18. Curva D-E de crisoeriol durante la aplicación sostenida. A. Se obtuvo una IC₅₀ de 36 ± 6 μM, el efecto inhibitorio fue significativo a partir de 10 μM y a altas concentraciones se inhibió casi por completo la corriente al pico. **B.** Efecto de crisoeriol en el protocolo de aplicación sostenida, la concentración mostrada coincide con la IC₅₀. **C.** Efecto de crisoeriol (30 μM) sobre los parámetros de la corriente ASIC2a, se produce una inhibición en todos los parámetros de la corriente, siendo los más afectados la I pico, el componente sostenido y la integral.

Al realizar la comparación de las curvas D-E para cada tipo de aplicación del flavonoide encontramos que no existen diferencias significativas con respecto a la potencia del compuesto en los protocolos de co-aplicación y aplicación sostenida,

pues el flavonoide puede llegar a inhibir casi por completo la corriente al pico a altas concentraciones, mientras que para el caso de la pre-aplicación la potencia máxima fue de 40% de inhibición sobre la corriente al pico. En cuanto a la eficacia, si bien no hay diferencias significativas entre las IC50 para la aplicación sostenida y la pre-aplicación, el efecto inhibitorio es mucho mayor para el primer caso, por lo que podemos decir que el protocolo con el cual se observa una mayor potencia y eficacia es el de aplicación sostenida (Fig. 19).

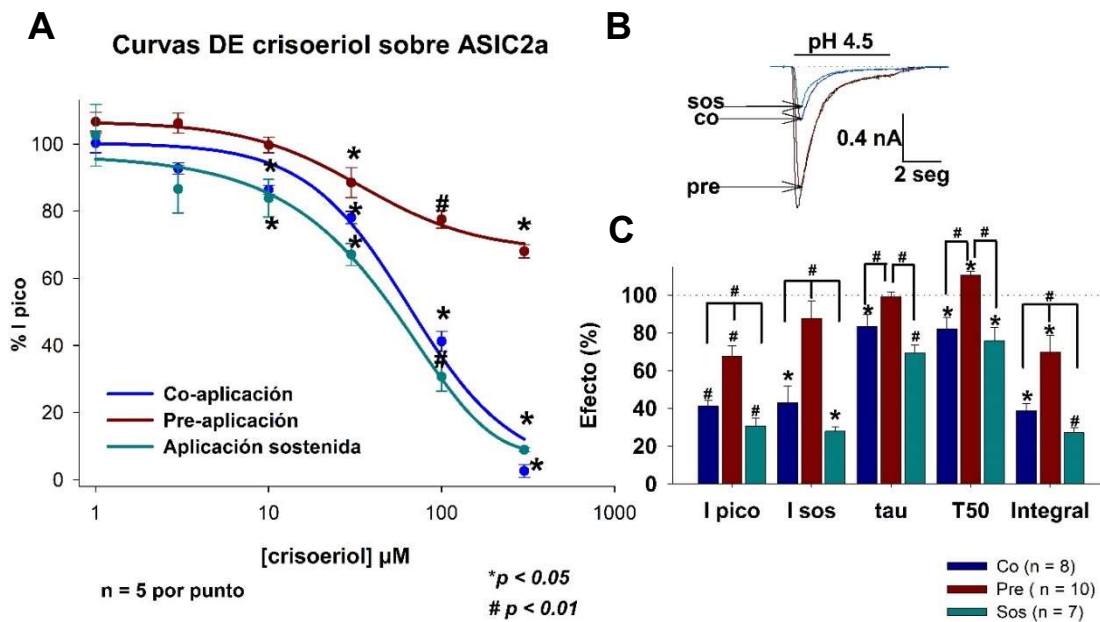


Figura 19. Comparación de las curvas D-E para crisoeriol en todos los protocolos de aplicación. **A.** Curvas D-E para crisoeriol en los diferentes tipos de aplicación, la eficacia del flavonoide en la pre-aplicación fue menor que en los otros protocolos, la mayor eficacia fue en aplicación sostenida. **B.** Registro del efecto de crisoeriol en la corriente ASIC2a en los 3 protocolos de aplicación. **C.** Comparación del efecto de crisoeriol (30 μM) en los parámetros de la corriente ASIC2a en los 3 protocolos de aplicación, los mayores efectos inhibitorios se observaron durante la co-aplicación y la aplicación sostenida que inhibieron todos los parámetros de la corriente. En la corriente al pico, el componente sostenido y la integral los efectos entre estos dos protocolos de aplicación fueron significativamente diferentes.

Dependencia del efecto de crisoeriol del pH y desensibilización de estado estable de la corriente ASIC2a

Medimos la relación de la respuesta a pH para ASIC2a en condiciones control y en presencia de crisoeriol 40 μM para saber si la presencia de este compuesto afectaba de alguna manera la sensibilidad del canal al pH extracelular, encontramos que el pH_{50} para ASIC2a en condiciones control es de 4.4 ± 0.05 y en presencia de crisoeriol es de 4.5 ± 0.1 y aunque el crisoeriol produce cierto desplazamiento de la curva a valores menos ácidos, este no es significativo (Fig. 20).

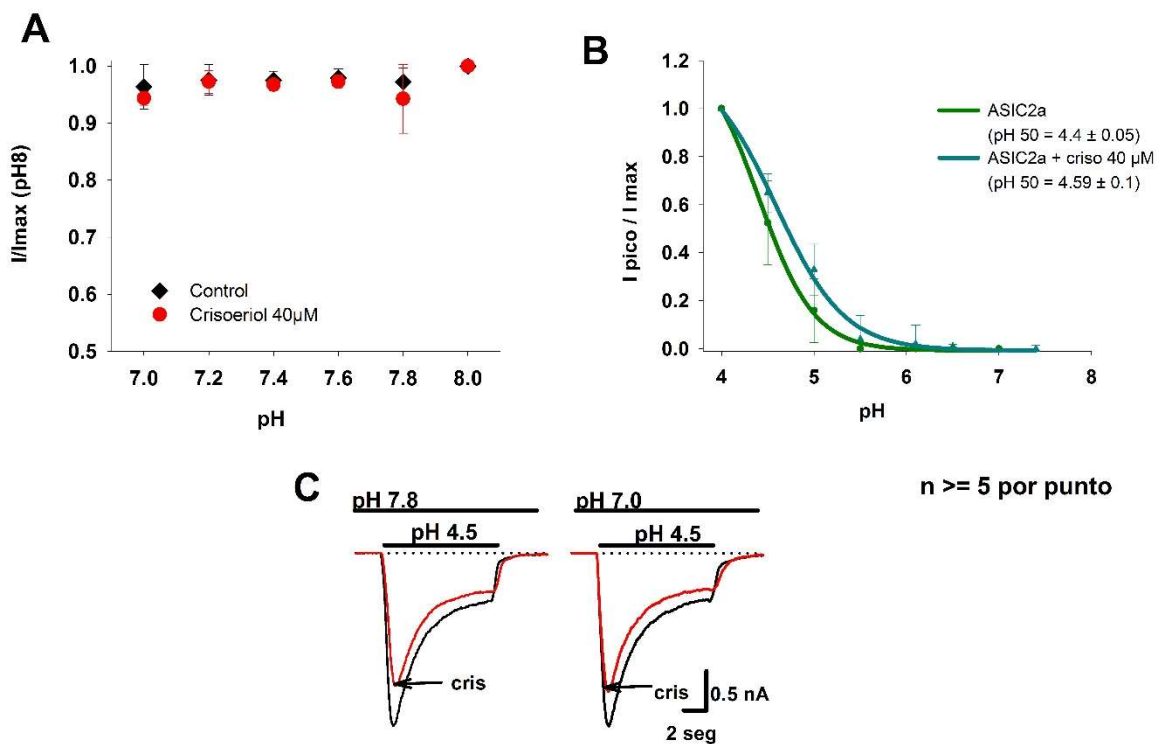


Figura 20. Dependencia de pH y desensibilización del estado estable de la corriente ASIC2a. **A.** Protocolo de desensibilización en estado estable con y sin crisoeriol 40 μM . No se observan diferencias significativas entre ambos protocolos. **B.** Curva de dependencia a pH para las corrientes producidas por homómeros ASIC2a en condiciones control y con crisoeriol 40 μM . Aunque se observa un ligero corrimiento de la curva hacia valores menos ácidos este desplazamiento no es significativo. **C.** Trazos representativos del efecto de la desensibilización de la corriente ASIC2a en control y con crisoeriol 40 μM . No encontramos diferencia significativa al cambiar los pH de sostenimiento.

Para la desensibilización del estado estable de la corriente ASIC2a empleamos un protocolo en el cual el pH de sostenimiento varió en un rango de 7.0 a 8.0, una vez obtenida la curva control se volvió a realizar el protocolo pero en presencia de crisoeriol 30 μM , no encontramos diferencias significativas entre los dos protocolos (Fig. 20).

Análisis in silico del anclaje de crisoeriol en el canal ASIC

En el 2007 se describió por primera vez la estructura cristalográfica del canal homomérico ASIC1a de pollo, gracias a este trabajo y a estudios posteriores (Jasti et al., 2007; González et al., 2009) pudo conocerse la estructura del canal es estado desensibilizado y más tarde en estado abierto (Bancoguis et al. 2014), por lo cual ahora es posible mediante el uso de programas especializados (AutoDock Vina y UCSF Chimera) realizar un análisis de potenciales sitios de unión del compuesto al canal ASIC1a y aunque el propósito de este trabajo no es realizar un modelaje matemático de la interacción del compuesto con el canal ASIC, el conocer los probables sitios de unión que puedan existir entre ambos nos ayudan en gran manera a comprender la actividad de este compuesto sobre el canal.

Para el modelaje *in silico* empleamos los programas AutoDock Vina y UCSF Chimera, así como dos estructuras diferentes del canal ASIC obtenidas del *Protein Data Bank* (PDB), una de las estructuras empleadas fue la del canal en estado inactivado publicada por Gonzales et al. en el 2009 (PDB 4NYK) en la cual se añaden residuos en las porciones carboxilo (452-466) y amino terminal (2-45) a la estructura reportada por Jasti en el 2007, por lo que es conveniente aclarar que debido a eso todos los residuos reportados usando la estructura publicada por Gonzales equivalen a los residuos reportados por Jasti et al. 2007 pero aumentando una posición más, así pues, el aminoácido reportado como H⁷³ en la cristalografía de González es el equivalente al reportado por Jasti como H⁷⁴. Otra de las estructuras empleadas para el análisis *in silico* fue la reportada por Bancoguis et al en el 2014, la cual es una co-cristalización del canal ASIC1a (4NWT) unido a la toxina MitTx lo que permite observar la estructura del canal durante el estado abierto.

Encontramos que en el estado desensibilizado el crisoeriol tiene preferencia por la porción extracelular del canal y el vestíbulo central (Fig. 21). La interacción de crisoeriol a la porción extracelular del canal se da a nivel del residuo D⁷⁹, se ha propuesto que durante el estado desensibilizado el aspartato 79 forma un enlace con la histidina 73 y en conjunto con otros aminoácidos (H⁷²/H⁷³ y E⁷⁹) tienen un papel crucial en el “gating” del canal ASIC (Grunder et al. 2010), por lo que la unión

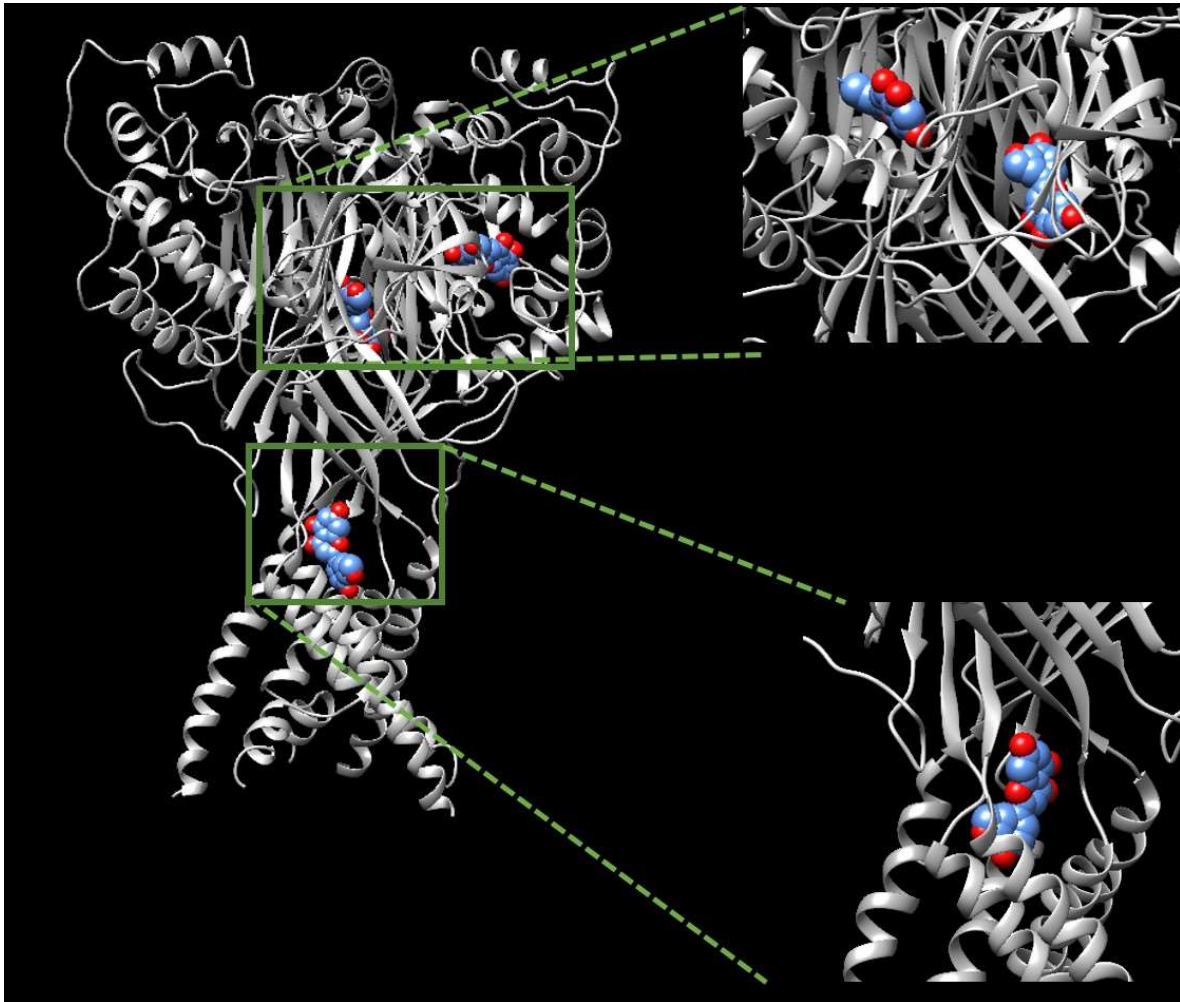
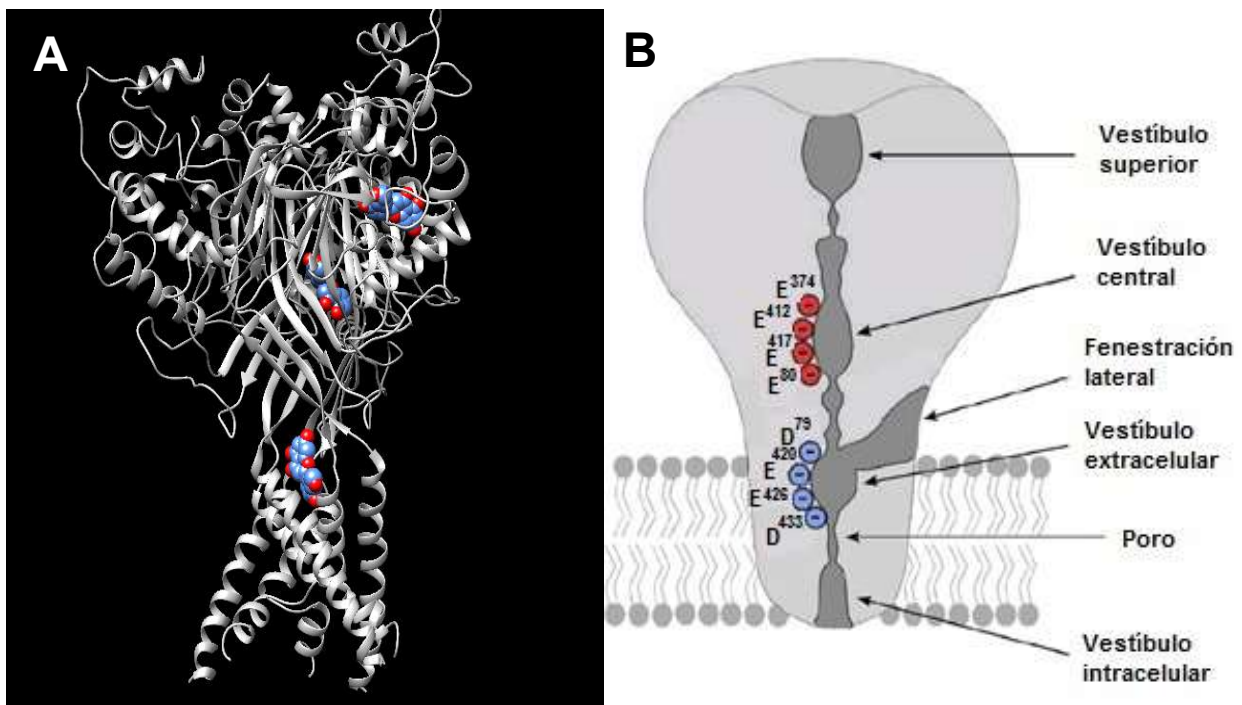


Figura 21. Analisis de la unión de crisoeriol al canal homomérico ASIC1a. **A.** Las interacciones con mayor afinidad se dan a nivel de la porción extracelular del canal y en el vestíbulo central (afinidad de -8.5 kcal/mol) mientras que la interacción con la región justo por encima de las alfa hélices de los segmentos transmembrana es de -8.3 kcal/mol. **B.** Acercamiento de la interacción del flavonoide con la porción extracelular del canal, esta se da a nivel del residuo D⁷⁹ relacionado con el gating del canal. **C.** Acercamiento de la interacción de crisoeriol con la región de las alfa hélices que conforman los dominios transmembrana del canal, el sitio de unión se da a nivel del residuo E426, el cual puede experimentar cambios conformacionales durante el gating del canal.

del flavonoide en este sitio podría estar relacionado con su efecto inhibitorio al contribuir a la modulación del gating del canal (Fig. 21).

Los vestíbulos en la porción extracelular del canal tienen potenciales electrostáticos negativos debido a la concentración de residuos aminoacídicos en el vestíbulo central (Glu⁸⁰, Glu³⁷⁴, Glu⁴¹² y Glu⁴¹⁷) y el extracelular (Asp⁷⁹, Glu⁴²⁰, Glu⁴²⁶ y Asp⁴³³) por lo que se ha propuesto que funcionan como “reservorio de cationes” que al estar cerca del poro contribuyen a la generación de una mayor conductancia del canal.

En el análisis in silico encontramos que crisoeriol es capaz de unirse a dos de los residuos acídicos presentes en el vestíbulo central del canal (E³⁷⁴ y E⁴¹²), por lo cual podría explicarse su capacidad para producir una inhibición sobre la corriente ASIC (Fig. 22).



Además de los sitios de unión antes mencionados, nuestros análisis demuestran que el flavonoide crisoeriol también puede interactuar con la región que se encuentra inmediatamente por fuera de las alfa hélices transmembrana de la subunidad ASIC, esta unión se da principalmente a nivel del residuo E⁴²⁶ pero los aminoácidos circundantes también presentan cierto grado de afinidad por el crisoeriol. Estudios realizados a los residuos circundantes a E⁴²⁶ han demostrado que esta región puede experimentar cambios conformacionales durante el “*gating*” del canal por lo que se ha sugerido que está involucrada en la transducción de señales del dominio extracelular hacia el poro modificando con ello los cambios en el estado de conductividad del canal (Passero et al. 2009; Sherwood et al 2011) aunque no se ha determinado aún si el residuo E⁴²⁶ está implicado directamente en la unión de calcio al canal o si tiene un efecto alostérico en el bloqueo del canal mediado por calcio.

En cuanto a la interacción del canal con el estado abierto, los análisis realizados indican que las interacciones más afines se dan a nivel de la porción extracelular del canal, principalmente con la región del vestíbulo central uniéndose a nivel de los residuos P35 y T37, lo cual es coincidente con el área de interacción de crisoeriol y

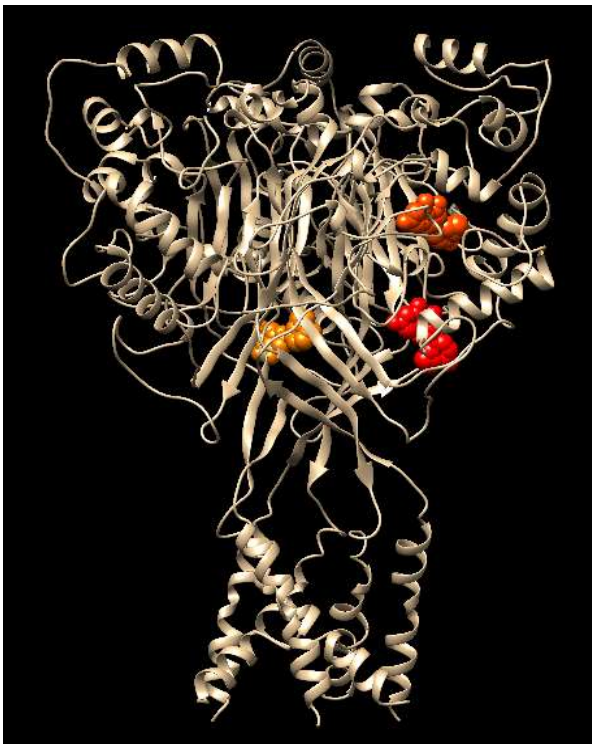


Figura 23. Análisis in silico de la interacción de crisoeriol con el canal ASIC en estado abierto. Los sitios de unión del flavonoide crisoeriol sobre la estructura del canal ASIC1a se dan principalmente a nivel de la porción extracelular, observamos una fuerte interacción con el vestíbulo central (molécula en amarillo) que se da a nivel de los residuos P35 y T37, (afinidad -9.0 kcal/mol), así como otros dos posibles sitios de unión a nivel de la unión del pulgar con la región del dedo (molécula en rojo) y la porción comprendida por el pulgar, la palma y la bola beta (molécula naranja) en el residuo aminoácido E239 y los aminoácidos circundantes.

al canal ASIC durante el estado desensibilizado, por lo cual podríamos sugerir que crisoeriol tiene alta afinidad por el vestíbulo central tanto en estado desensibilizado como abierto por lo que el efecto inhibitorio observado durante la aplicación sostenida se debe principalmente a la unión del crisoeriol a esta región. Encontramos otros dos sitios de unión con alta afinidad durante el estado abierto, estos se encuentran en la región que une el área del pulgar con el dominio del dedo G288, así como en la región que incluye a la palma, el pulgar y la bola β (E239 y aminoácidos circundantes) (Dawson et al 2012) por lo que la unión del crisoeriol a estos sitios podría provocar la inhibición de la corriente (Fig.23)

Relación estructura-actividad de los flavonoides: crisoeriol, 7-O- β -D-glucopiranosido y ThB.

La analogía entre los diferentes compuestos empleados nos permite inferir si su estructura influye en la actividad que tienen sobre los canales ASIC. Todos los compuestos probados tienen como base la misma aglicona (crisoeriol), esta se encuentra unida a un azúcar en el caso del compuesto 7-O- β -D-glucopiranosido y a un azúcar sulfatado en el caso de ThB, por lo cual analizamos la diferencia entre los efectos de estos compuestos sobre cada una de las subunidades ASIC y bajo los 3 protocolos de aplicación que establecimos con anterioridad.

Para la co-aplicación encontramos que sobre la subunidad 1a no hay una diferencia entre el efecto inhibitorio producido por estos 3 compuestos, mientras que para las demás subunidades existe una marcada diferencia entre el efecto del crisoeriol y los otros dos, lo que nos indica que la aglicona sola tiene más efecto que al estar unida con un azúcar o un azúcar sulfatado (Fig 24), cabe señalar que todos los efectos inhibitorios sobre las corrientes fueron completamente reversibles.

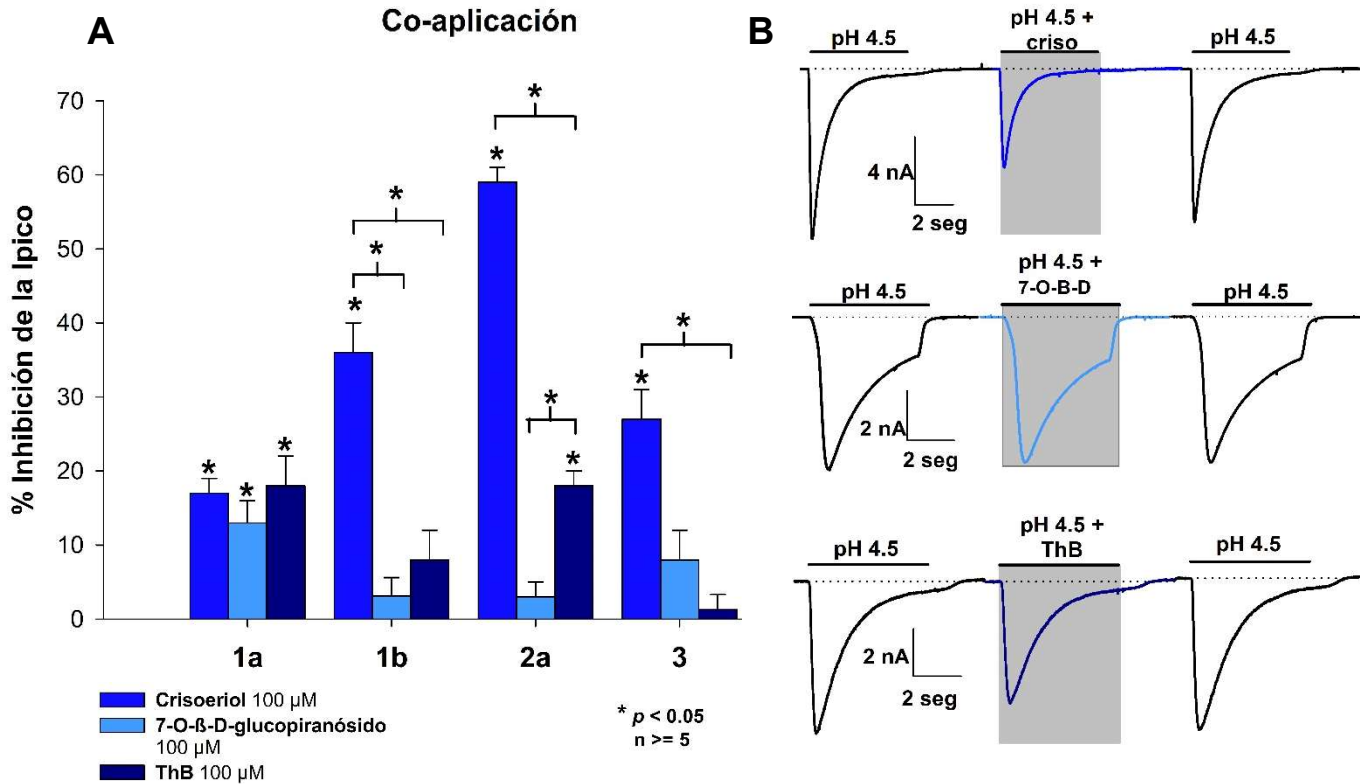


Figura 24. Efecto de la co-aplicación de 3 compuestos obtenidos a partir de *Thalassia testudinum* sobre las corrientes ASIC. A. No hay diferencia significativa entre el efecto inhibitorio de ninguno de los compuestos sobre la subunidad ASIC1a. Si bien no existen diferencias entre el efecto de crisoeriol 7-O-β-D-glucopiranosido y ThB sobre la subunidad ASIC1b y 3 el efecto de dichos compuestos es significativamente diferente al de crisoeriol. El mayor efecto inhibitorio se observó en la subunidad 2a con la aplicación de crisoeriol. **B.** Trazos representativos del efecto producido por los 3 diferentes compuestos sobre la subunidad ASIC2a.

Durante el protocolo de pre-aplicación solo se observó efecto con la aplicación de crisoeriol, cabe señalar que dicha inhibición fue significativa para todas las subunidades ASIC, siendo ASIC2a nuevamente la más afectada. Esto sugiere que crisoeriol tiene un efecto inhibitorio al interactuar con el canal estado cerrado o inactivado, mientras que los compuestos que contienen un azúcar o un azúcar sulfatado son incapaces de producir efecto (Fig. 25).

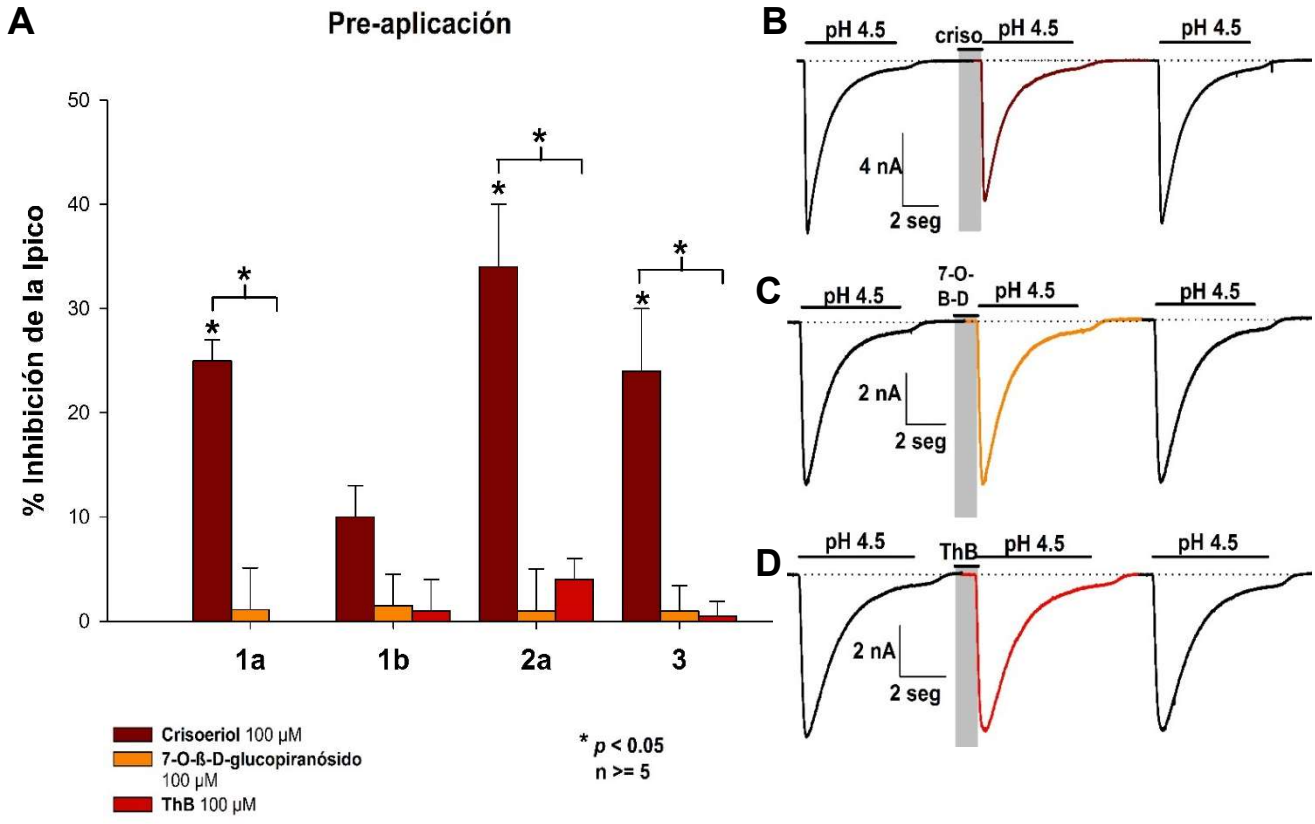


Figura 25. Efecto de la pre-aplicación de 3 compuestos obtenidos a partir de *Thalassia testudinum* sobre las corrientes ASIC. La pre-aplicación de la glicona sola (crisoeriol) produce un efecto inhibitorio sobre todas las corrientes ASIC. Los otros dos compuestos no alteran la corriente. Corrientes homoméricas ASIC2a y el efecto de la pre-aplicación de **B.** crisoeriol **C.** crisoeriol7-O-β-D-glucopiranosido y **D.** ThB.

Finalmente, en el caso de la aplicación sostenida volvemos a observar que crisoeriol tiene un efecto inhibitorio en todas las subunidades ASIC, siendo mucho más marcado sobre la subunidad ASIC2a ($72 \pm 2\%$) mientras que crisoeriol 7-O-β-D-glucopiranosido no produce ningún efecto significativo. Es importante señalar el efecto que tiene ThB sobre la subunidad ASIC1b pues produce un incremento ($18 \pm 4\%$) en la corriente, el cual puede inferirse es debido al azúcar sulfatado (Fig.26).

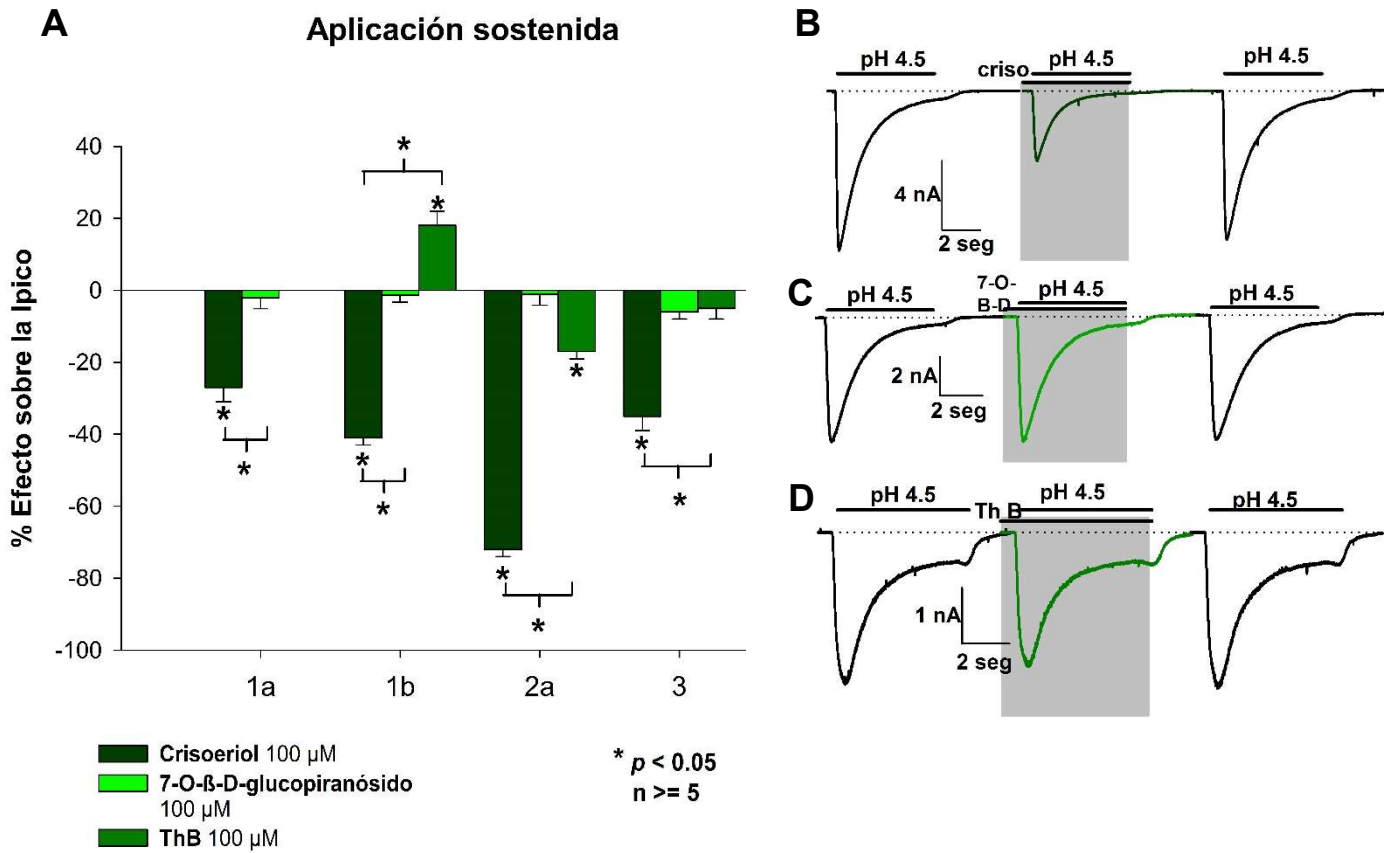


Figura 26. Efecto de la aplicación sostenida de 3 compuestos obtenidos a partir de *Thalassia testudinum* sobre las corrientes ASIC. A. 7-O-β-D-glucopiranosido no tiene efecto sobre ninguna subunidad ASIC. Crisoeriol inhibe la Ipico de todas las corrientes homoméricas ASIC, teniendo el mayor efecto sobre ASIC2a (inibición del $72 \pm 2\%$). La aplicación de thalasiolina B potencia la corriente al pico de los homómeros ASC1a en un $18 \pm 4\%$. Todos los efectos fueron completamente reversibles. Corrientes representativas de homómeros ASIC2a con el protocolo de aplicación sostenida con **B.** crisoeriol. **C.** crisoeriol 7-O-β-D-glucopiranosido **D.** ThB para los diferentes flavonoides.

DISCUSIÓN

Con el paso de los años las moléculas flavonoides han ido tomando más relevancia pues su peculiar estructura, su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica y los pocos efectos secundarios relacionados con su consumo los vuelven herramientas de interés farmacológico (Kumar y Pandey 2013; Seleem et al. 2017).

Desde su descripción original en 2002 la thalasiolina y sus derivados han sido ampliamente estudiados como agentes farmacológicos (Aneiros et al. 2002; Rodríguez et al. 2002; Regalado et al. 2009, 2011, 2012). Nuestro estudio sugiere que los canales iónicos ASIC responden a dos de los tres flavonoides estudiados: thalasiolina B y crisoeriol. Aunque ambos pertenecen a la misma familia de flavonoides, difieren en su estructura al tener o no un azúcar sulfatado. Proponemos que las variaciones estructurales y la interacción de los flavonoides con las regiones expuestas durante los distintos estados del canal, son la causa de las diferencias entre los efectos de estos compuestos sobre las subunidades ASIC. Pese a que se ha descrito que algunos flavonoides son capaces de atravesar la membrana celular, no es el caso del crisoeriol (Kang et al. 2010) por lo que su acción sobre el canal a través de segundos mensajeros es poco factible, sin embargo existe la posibilidad de que sea capaz de actuar de manera indirecta sobre el canal a través de alteraciones inducidas en la membrana plasmática debidas a una interacción directa con los fosfolípidos de la bicapa, pues los ASICs pueden responder a estiramientos en la membrana (Allen and Atwell 2002). No obstante, tomando en cuenta el tiempo en que tardan en aparecer los efectos tras la exposición al fármaco y considerando los antecedentes farmacológicos de la corriente ASIC, no parece factible que este sea el caso. Es por ello que en nuestra discusión partimos de un esquema en el cual los efectos observados responden a una interacción directa entre los flavonoides y los ASIC.

Para la aplicación de los flavonoides empleamos tres diferentes protocolos con distintos tiempos de exposición, en los cuales el compuesto interactúa con el canal cuando se encuentra en diferentes estados. En el protocolo de co-aplicación el

fármaco es liberado en conjunto con el pulso ácido (5 segundos) por lo que entra en contacto con los canales cuando estos están en su mayoría en estado abierto y/o abierto-desensibilizado de manera que es capaz de interactuar con regiones tales como el filtro de selectividad y los vestíbulos extracelulares (Bancoguis et al., 2014), por otro lado el protocolo de pre-aplicación permite que los compuestos interactúen durante 10 segundos con el canal en un estado estable, cuando los grupos protonables del canal están ocupados por iones como el calcio (estado cerrado/no desensibilizado) (Jasti et al, 2007; Gonzales et al., 2008). Finalmente el protocolo de aplicación sostenida implica la presencia del compuesto antes y durante el pulso ácido, permitiendo con ello que la interacción del flavonoide con el canal sea mucho más prolongada (15 segundos) y se dé antes y durante el proceso de apertura (Grunder and Push 2015). Estas condiciones de aplicación representan diferentes estados en la estructura y perfil electrostático del canal (Grunder et al., 2010; Bancoguis et al., 2014), lo cual puede influir directamente en la forma en que este interactúa con los flavonoides y nos ayudan a dilucidar los mecanismos de acción de los flavonoides sobre los canales.

Los efectos de thalasiolina B sobre la corriente ASIC son distintos acorde con el tipo de exposición al fármaco, pudiendo distinguirse un efecto potenciador en el caso de la subunidad ASIC1b durante la aplicación sostenida y una tendencia inhibitoria sobre la amplitud de la corriente cuando se co-aplica. Esto puede ser explicado de dos formas distintas. La más simple es que las diferencias temporales del efecto dependen únicamente de la Kd de los fármacos, siendo mucho mayor el tiempo de exposición del compuesto durante el protocolo de aplicación sostenida. Otra explicación posible para estas diferencias es que los cambios en el pH y la consecuente activación de canal se encuentren alterando el sitio de unión para los flavonoides, lo que haría que estas drogas tengan un efecto dependiente de estado.

La subunidades 1b y 1a tienen una gran homología variando únicamente en el primer tercio de la proteína, mientras que las dos terceras partes del extremo carboxilo terminal son idénticas (Lingueglia et al. 2007) por lo que era esperable encontrar un efecto similar en ambas isoformas, pese a ello los efectos de

thalasiolina B durante la aplicación sostenida fueron completamente diferentes, si bien esto puede parecer extraño, no es el único compuesto que produce efectos contrastantes sobre estas subunidades, ejemplo de ello es la toxina PcTx1, la cual a la misma concentración es capaz de inhibir específicamente a la subunidad ASIC1a y potenciar la corriente al pico de la subunidad ASIC1b, esto se debe a que aumenta la afinidad del canal por los protones, así en el caso del ASIC1a el canal se vuelve tan sensible que a pH normal es capaz de pasar a estado desensibilizado por lo que al aplicar pH ácido el canal es incapaz de responder, por lo que esta toxina se convierte en un inhibidor específico para la subunidad ASIC1a (Chen et al., 2005 y 2006), debido a lo anterior podríamos proponer que el efecto inhibitorio producido por la thalasiolina B es en algo semejante al de PcTx1, aunque a diferencia de PcTx1 que es capaz de inhibir toda la corriente thalasiolina B es mucho menos eficaz.

En cuanto a la inhibición producida crisoeriol, sugerimos dos posibles explicaciones, la primera y más simple es la oclusión directa del poro desde el lado extracelular de la membrana en un mecanismo análogo al que se ha propuesto para el efecto del calcio o la amilorida sobre los ASICs (Adams et al., 1999; Sheng et al., 2001a; Paukert et al., 2004; Immke & McCleskey, 2003). La segunda está relacionada con los resultados obtenidos in silico, proponemos que la unión de este compuesto a la región por encima de las alfa hélice transmembrana dificulta el cambio conformacional del canal del estado cerrado-inactivado a abierto produciendo una inhibición de la corriente (durante la pre-aplicación), mientras que la unión de este compuesto al vestíbulo central (considerado un “reservorio de cationes” cuya función es atraer los iones para facilitar su paso a través del canal (Grunder et al., 2010)) durante el estado abierto (co-aplicación) disminuye la cantidad de cationes presentes en esta región y con ello la corriente. Por lo cual sugerimos que el efecto inhibitorio observado durante la aplicación sostenida se debe a la interacción del flavonoide con los dos sitios antes mencionados.

Implicaciones fisiológicas y potenciales aplicaciones de flavonoides en patología

Los canales activados por pH tienen gran relevancia debido a su importante participación en procesos fisiológicos y fisiopatológicos tales como nocicepción, mecanopercepción, plasticidad sináptica, desarrollo de la potenciación a largo plazo, esclerosis múltiple, epilepsia e isquemia cerebral entre otras. (Mercado et al., 2006; Lingueglia et al., 2007; Lu et al., 2009; Wemmie et al., 2009, Baron y Lingueglia 2015).

Durante la inflamación cutánea los valores de pH en la zona afectada caen por debajo de las condiciones normales, oscilando en rangos de 5.5 a 7 (Yu et al., 2015), lo cual es suficiente para activar a los canales ASIC. Compuestos inhibidores de los ASIC han demostrado tener un efecto analgésico en modelos animales (e incluso humanos) de dolor, mientras que aquellos compuestos capaces de activar a estos canales provocan un comportamiento de dolor, lo cual sustenta el papel de los ASICs en la transducción del dolor cutáneo (Wemmie et al., 2013; Jones et al., 2004; Ugawa et al., 2002; Diochot et al., 2012; Bohlen et al., 2011). Nuestros resultados proveen información suplementaria sobre los flavonoides derivados de *Thalassia testudinum*, si bien ya se ha reportado un efecto analgésico de thalasiolina B en ciertos modelos de dolor (Garateix et al., 2011), la acción inhibitoria de crisoeriol sobre las corrientes ASIC presentes en nGRD sugiere que también puede ser una herramienta factible para el estudio de la nocicepción.

La activación de los ASIC tiene un papel fundamental en el daño neuronal mediado por acidosis. La privación del flujo sanguíneo a nivel cerebral provoca condiciones de hipoxia que pueden activar a los canales ASIC produciendo una despolarización de la membrana y provocando la entrada de calcio a las neuronas a través de los homómeros ASIC1a, heterómeros ASIC 1a/2b, canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y receptores NMDA (Xiong et al., 2004; Mari et al., 2010; Gao et al., 2005). La inyección intracerebroventricular de bloqueadores específicos para ASIC1a reduce el volumen de infarto inducido por isquemia focal transitoria hasta en un 60%. De manera semejante, estudios realizados en ratones knock-out para la subunidad ASIC1a, reportan una neuroprotección significativa *in vivo* durante la

isquemia cerebral (Xiong y cols. 2004). Además de toxinas, se han empleado otro tipo de componentes naturales con efecto inhibitorio sobre los ASIC para tratar de disminuir el daño isquémico, tal es el caso varios compuestos empleados en la medicina tradicional China (puerarina, sofocarpina y ginsenosoide-Rd ginsenosoide-Rd) (Gu et al., 2010; Zhang et al., 2012). Análisis in silico han explorado el papel neuroprotector del flavonoide quercetina en la isquemia cerebral proponiendo una inhibición sobre las metaloproteinasas de matriz y los canales ASIC (Pandey et al. 2012).

Recientemente Mukhopadhyay y colaboradores demostraron que la quercetina inhibe selectivamente a los ASIC debido a su unión en el vestíbulo central del canal, estos resultados son similares a los que encontramos con el flavonoide crisoeriol, lo cual tiene sentido dada la similitud estructural entre ambas moléculas. Si bien nosotros no probamos el efecto de crisoeriol sobre otros canales como P2X, GABA o NMDA, el nulo efecto de quercetina sobre dichos canales sugiere que crisoeriol tampoco producirá efecto (Mukhopadhyay et al., 2017), no obstante es necesario probarlo sobre diferentes canales iónicos para asegurar la especificidad de este flavonoide sobre los canales ASIC.

Por todo lo anterior proponemos que el flavonoide crisoeriol derivado de *Thalassia testudinum* es un inhibidor de las corrientes ASIC homo y heteroméricas y su efecto depende tanto del tipo de corriente ASIC del que se trate, como de la forma en que el canal es expuesto al fármaco. Todo lo anterior, hace de estas moléculas herramientas farmacológicas válidas para el estudio de los ASICs.

CONCLUSIONES

Crisoeriol 7-O-B-glucopiranosido tiene efecto selectivo sobre la subunidad ASIC1a en la co-aplicación, produciendo una ligera inhibición de la I_{pico} pero sin alterar ningún otro parámetro de la corriente. No tiene efecto sobre ninguna otra subunidad.

Thalasiolina B tiene un efecto inhibitorio sobre I_{pico} que es selectivo sobre ASIC1a y ASIC2a (sin efecto sobre ASIC3). Paradójicamente tiene un efecto potenciador sobre la I_{pico} de ASIC1b.

Crisoeriol tiene un efecto inhibitorio sobre I_{pico} consistente en todas las subunidades ASIC en todas las condiciones experimentales de este trabajo.

El efecto máximo de crisoeriol fue sobre la subunidad ASIC2a, con la aplicación sostenida inhibió la I_{pico} 70% con una CI_{50} de 36 μ M.

Con excepción de crisoeriol, ninguno de los flavonoides estudiados modificó parámetros cinéticos de las corrientes ASIC.

Ni la sensibilidad a pH del ASIC2a ni la inactivación de estado estable se modificaron significativamente con el crisoeriol.

El efecto inhibitorio producido por el crisoeriol durante la aplicación sostenida, puede deberse a la interacción de este con la región del canal que se encuentra justo por encima de las alfa hélice transmembranales y la porción extracelular (análisis *in silico*) cuando el canal está en estado cerrado-desensibilizado en combinación con la subsecuente unión de crisoeriol al vestíbulo central del canal cuando este pasa a estado abierto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmad A., Kaleem M., Ahmed Z., Shafiq H. (2015). Therapeutic potential of flavonoids and their mechanism of action against microbial and viral infections—A review. *Food Research International*, vol. 77, pp. 221-235.
2. Almanza A., Mercado F., Vega R., Soto E., (2008). Extracellular pH modulates the voltage dependent Ca²⁺ current and low threshold K⁺ current in hair cells. *Neurochemical Research*, vol. 33, pp.1435-1441.
3. Alvarez de la Rosa D., Zhang P., Shao D., White F., Canessa, C. M. (2002). Functional implications of the localization and activity of acid- sensitive channels in rat peripheral nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 99, no. 4, pp. 2326-2331.
4. Anumonwo J.M., Horta J., Delmar M., Taffet S.M., Jalife J., (1999). Proton and zinc effects on HERG currents. *Biophysical Journal*; vol. 77, pp. 282-98.
5. Arun T., Tomassini V., Sbardella E., De Ruiter M. B., Matthews L., Leite M. I., Gelineau-Morel R., Cavey A., Vergo S., Craner M., Fugger L., Rovira A., Jekinson M., Palace J. (2013). Targeting ASIC1 in primary progressive multiple sclerosis: evidence of neuroprotection with amiloride. *Brain*, vol. 136, no 1, p. 106-115.
6. Askwith C. C., Cheng C., Ikuma M., Benson, C., Price M. P., Welsh M. J. (2000). Neuropeptide FF and FMRFamide potentiate acid-evoked currents from sensory neurons and proton-gated DEG/ENaC channels. *Neuron*, vol. 26, no. 1, pp. 133-141.
7. Babini E., Paukert M., Geisler H. S., Gründer S. (2002). Alternative splicing and interaction with di- and polyvalent cations control the dynamic range of acid-sensing ion channel 1 (ASIC1). *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 44, pp.41597-41603.
8. Bacongus I., Bohlen C. J., Goehring A., Julius D., Gouaux E. (2014). X-Ray structure of acid-sensing ion channel 1–snake toxin complex reveals open state of a Na⁺-selective channel. *Cell*, vol. 156, no. 4, pp.717-729.
9. Bacongus I.; Gouaux E. (2012). Structural plasticity and dynamic selectivity of acid-sensing ion channel-spider toxin complexes. *Nature*, vol. 489, no 7416, p. 400-405.

10. Báez A., Salceda E., Fló M., Graña M., Fernández, C., Vega R., Soto E. (2015). α -Dendrotoxin inhibits the ASIC current in dorsal root ganglion neurons from rat. *Neuroscience letters*, vol. 606, pp. 42-47.
11. Banke T.G., Dravid S.M. y Traynelis S.F., (2005) Protons trap NR1/NR2B NMDA receptors in a nonconducting state. *Journal of Neuroscience*, vol. 25, pp. 42-51.
12. Baptista F. I., Henriques A. G., Silva A. M., Wiltfang J., da Cruz e Silva O. A. (2014). Flavonoids as therapeutic compounds targeting key proteins involved in Alzheimer's disease. *ACS chemical neuroscience*, vol. 5, no. 2, pp. 83-92.
13. Baron A., Diochot S., Salinas M., Deval E., Noël J., Lingueglia, E. (2013). Venom toxins in the exploration of molecular, physiological and pathophysiological functions of acid-sensing ion channels. *Toxicon*, vol. 75, pp. 187-204.
14. Baron A., Lingueglia E. (2015). Pharmacology of acid-sensing ion channels—Physiological and therapeutical perspectives. *Neuropharmacology*, vol. 94, pp. 19-35.
15. Baron A., Schaefer, L., Lingueglia E., Champigny G., Lazdunski M. (2001). Zn²⁺ and H⁺ are coactivators of acid-sensing ion channels. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 38, pp. 35361-35367.
16. Bartoi T., Augustinowski, K., Polleichtner, G., Gründer, S., & Ulbrich, M. H. (2014). Acid-sensing ion channel (ASIC) 1a/2a heteromers have a flexible 2: 1/1: 2 stoichiometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 111, no 22, p. 8281-8286
17. Berdiev B. K., Xia J., McLean L. A., Markert J. M., Gillespie G. Y., Mapstone T., Naren A.P., Jovov B., Bubien J.K., Ji H.-L., Fuller C.M., Kirk K.L., Benos D. J. (2003). Acid-sensing ion channels in malignant gliomas. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no 17, p. 15023-15034.
18. Bianchi L.; Driscoll M. (20002). Protons at the gate: DEG/ENaC ion channels help us feel and remember. *Neuron*, vol. 34, no 3, p. 337-340.
19. Birdsong W. T., Fierro L., Williams F. G., Spelta V., Naves, L. A., Knowle, M., McCleskey E. W. (2010). Sensing muscle ischemia: coincident detection of acid and ATP via interplay of two ion channels. *Neuron*, vol. 68, no. 4, pp. 739-749.

20. Blanchard M. G.; Rash L. D.; Kellenberger S. (2012). Inhibition of voltage-gated Na⁺ currents in sensory neurones by the sea anemone toxin APETx2. *British journal of pharmacology*, vol. 165, no 7, p. 2167-2177.
21. Bohlen C. J., Chesler A. T., Sharif-Naeini R., Medzihradzsky K. F., Zhou S., King D., Sánchez E.E., Burlingame A.L., Basbaum A.I., Julius D. (2011). A heteromeric Texas coral snake toxin targets acid-sensing ion channels to produce pain. *Nature*, vol. 479, no 7373, p. 410-414.
22. Boiko N., Kucher V., Eaton B. A., Stockand J. D. (2013). Inhibition of neuronal degenerin/epithelial Na⁺ channels by the multiple sclerosis drug 4-aminopyridine. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, no. 13, pp. 9418-9427.
23. Cabo R., Galvez M. A., San Jose I., Laurà R., López-Muñiz A., García-Suárez O., Cobo T., Insausti R., Vega J.A. (2012). Immunohistochemical localization of acid-sensing ion channel 2 (ASIC2) in cutaneous Meissner and Pacinian corpuscles of *Macaca fascicularis*. *Neuroscience letters*, vol. 516, no 2, p. 197-201.
24. Cadiou H., Studer M., Jones N. G., Smith E. S. J., Ballard A., McMahon S. B., McNaughton P. A. (2007). Modulation of acid-sensing ion channel activity by nitric oxide. *Journal of Neuroscience*, vol. 27, no. 48, pp.13251-13260.
25. Cai Q., Qiu C. Y., Qiu F., Liu T. T., Qu Z. W., Liu Y. M., Hu W. P. (2014). Morphine inhibits acid-sensing ion channel currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain research*, vol. 1554, pp. 12-20.
26. Cao Q., Wang W., Gu J., Jiang G., Wang K., Xu Z., Li J., Chen G., Wang X. (2016). Elevated expression of acid-sensing ion channel 3 inhibits epilepsy via activation of interneurons. *Molecular neurobiology*, vol. 53, no 1, p. 485-498.
27. Cao Q.-Q.; Wang X.-F. (2014). Function of acid-sensing ion channels and its influence in the development of epilepsy. *Chinese Journal of Contemporary Neurology and Neurosurgery*, vol. 14, no 11, p. 936-941.
28. Carrillo-Esper R.; Visoso-Palacios P. (2006) Actualidades del equilibrio ácido base. *Revista Mexicana de Anestesiología*, vol. 29, no S1, p. 291-293.
29. Catarsi S., Babinski K., Seguela, P. (2001). Selective modulation of heteromeric ASIC proton-gated channels by neuropeptide FF. *Neuropharmacology*, vol. 41, no. 5, pp. 592-600.

30. Chagot B., Escoubas P., Diochot S., Bernard C., Lazdunsi, M., Darbon H. (2005). Solution structure of APETx2, a specific peptide inhibitor of ASIC3 proton-gated channels. *Protein science*, vol.14, no. 8, pp. 2003-2010.
31. Chen X. Kalbacher H. Gründer S. (2005). The tarantula toxin psalmotoxin 1 inhibits acid-sensing ion channel (ASIC) 1a by increasing its apparent H⁺ affinity. *The Journal of general physiology*, vol. 126, no 1, p. 71-79.
32. Chen X., Qiu L., Li M., Dürrnagel S., Orser B. A., Xiong Z. G., MacDonald J. F. (2010). Diarylamidines: high potency inhibitors of acid-sensing ion channels. *Neuropharmacology*, vol. 58, no. 7, pp. 1045-1053.
33. Chen X.; Gründer S. (2007). Permeating protons contribute to tachyphylaxis of the acid-sensing ion channel (ASIC) 1a. *The Journal of Physiology*, vol. 579, no 3, p. 657-670.
34. Chesler M., (2003). Regulation and modulation of pH in the brain, *Physiological Reviews*, vol. 83, no 4, pp.: 1183-22, 2003.
35. Choi D. Y., Lee J. Y., Kim M. R., Woo E. R., Kim Y. G., & Kang K. W. (2005). Chrysoeriol potently inhibits the induction of nitric oxide synthase by blocking AP-1 activation. *Journal of Biomedical Science*, vol. 12, no. 6, pp. 949-959.
36. Chu X. P., Wemmie J. A., Wang W. Z., Zhu X. M., Saugstad J. A., Price M. P., Xiong Z. G. (2004). Subunit-dependent high-affinity zinc inhibition of acid-sensing ion channels. *Journal of Neuroscience*, vol. 24, no. 40, pp. 8678-8689.
37. Chu X.-P.; Xiong Z.-G. (2012). Physiological and pathological functions of acid-sensing ion channels in the central nervous system. *Current drug targets*, vol. 13, no 2, p. 263-271.
38. Cole A. L., Hossain S., Cole A. M., Phanstiel O. (2016). Synthesis and bioevaluation of substituted chalcones, coumaranones and other flavonoids as anti-HIV agents. *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 24, no. 12, pp. 2768-2776.
39. Coryell M. W., Ziemann A. E., Westmoreland P. J., Haenfler J. M., Kurjakovic Z., Zha X., Price M., Schnizler M.K., Wemmie J.A. (2007). Targeting ASIC1a reduces innate fear and alters neuronal activity in the fear circuit. *Biological psychiatry*, vol. 62, no 10, p. 1140-1148.

40. Cushman K. A., Marsh-Haffner, J., Adelman, J. P., McCleskey, E. W. (2007). A conformation change in the extracellular domain that accompanies desensitization of acid-sensing ion channel (ASIC) 3. *The Journal of general physiology*, vol. 129, no 4, p. 345-350.
41. Cushnie T. T., Lamb A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, vol. 26, no.5, pp. 343-356.
42. Cuyckens F., Claeys M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass spectrometry*, vol. 39, no. 1, pp. 1-15.
43. Deval E., Baron A., Lingueglia E., Mazarguil H., Zajac J. M., Lazdunski M. (2003). Effects of neuropeptide SF and related peptides on acid sensing ion channel 3 and sensory neuron excitability. *Neuropharmacology*, vol. 44, no. 5, pp. 662-671.
44. Deval E., Gasull,X., Noël,J., Salinas M., Baron A., Diochot S., Lingueglia E. (2010). Acid-sensing ion channels (ASICs): pharmacology and implication in pain. *Pharmacology & therapeutics*, vol. 128, no 3, p. 549-558.
45. Deval E., Lingueglia E. (2015) Acid-sensing ion channels and nociception in the peripheral and central nervous systems. *Neuropharmacology*, vol. 94, pp. 49-57,
46. Deval E., Noël J., Gasull X., Delaunay A., Alloui A., Friend V., Eschailer A., Lazdunski M., Lingueglia E. (2011). Acid-sensing ion channels in postoperative pain. *Journal of Neuroscience*, vol. 31, no 16, p. 6059-6066.
47. Diniz T. C., Silva J. C., Lima-Saraiva S. R. G. D., Ribeiro F. P. R. D. A., Pacheco A. G. M., de Freitas R. M., Almeida, J. R. G. D. S. (2015). The role of flavonoids on oxidative stress in epilepsy. *Oxidative medicine and cellular longevity*, vol. 2015.
48. Diochot S., Baron A., Rash L. D., Deval E., Escoubas P., Scarzello S., Salinas M., Lazdunski M. (2004). A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. *The EMBO journal*, vol. 23, no 7, p. 1516-1525.
49. Donier E., Rugiero F., Jacob C., Wood J. N. (2008). Regulation of ASIC activity by ASIC4—new insights into ASIC channel function revealed by a yeast two-hybrid assay. *European Journal of Neuroscience*, vol. 28, no 1, p. 74-86.
50. Duan B., Wang Y. Z., Yang T., Chu X. P., Yu Y., Huang Y., Xiong Z. G. (2011). Extracellular spermine exacerbates ischemic neuronal injury through sensitization of

- ASIC1a channels to extracellular acidosis. *Journal of Neuroscience*, vol. 31, no. 6, pp. 2101-2112.
51. Duan B., Wu L. J., Yu Y. Q., Ding Y., Jing L., Xu L., Chen J., Xu T.-L. (2007). Upregulation of acid-sensing ion channel ASIC1a in spinal dorsal horn neurons contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Journal of Neuroscience*, vol. 27, no 41, p. 11139-11148.
 52. Dube G. R. Lehto, S. G., Breese N. M., Baker S. J., Wang X., Matulenko M. A., Brioni, J. D. (2005). Electrophysiological and in vivo characterization of A-317567, a novel blocker of acid sensing ion channels. *Pain*, vol. 117, no. 1, pp. 88-96.
 53. Dubinnyi M. A., Osmakov D. I., Koshelev S. G., Kozlov S. A., Andreev, Y. A., Zakaryan, N. A., Grishin E. V. (2012). Lignan from thyme possesses inhibitory effect on ASIC3 channel current. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 39, pp. 32993-33000.
 54. Duda-Chodak A. (2012). The inhibitory effect of polyphenols on human gut microbiota. *Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 63, pp. 497-503.
 55. Dussor G. (2015). ASICs as therapeutic targets for migraine. *Neuropharmacology*, vol. 94, p. 64-71.
 56. Escoubas P., Bernar, C., Lambeau G., Lazdunski M., Darbon H. (2003). Recombinant production and solution structure of PcTx1, the specific peptide inhibitor of ASIC1a proton-gated cation channels. *Protein Science*, 12. 1332-1343.
 57. Escoubas P., De Weille J. R., Lecoq A., Diochot S., Waldmann R., Champigny G., Moinier D., Ménez A., Lazdunski M. (2000). Isolation of a tarantula toxin specific for a class of proton-gated Na⁺ channels. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no 33, p. 25116-25121.
 58. Ettaiche M., Deval E., Cougnon M., Lazdunski M., Voilley N (2006). Silencing acid-sensing ion channel 1a alters cone-mediated retinal function. *Journal of Neuroscience*, vol. 26, no 21, p. 5800-5809.
 59. Falcone Ferreyra, M. L., Rius S., Casati P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in plant science*, vol. 3, pp. 222.

60. Garateix A., Salceda E., Menéndez R., Regalado E. L., López O., García T., Soto E. (2011). Antinociception produced by *Thalassia testudinum* extract BM-21 is mediated by the inhibition of acid sensing ionic channels by the phenolic compound thalassiolin B. *Molecular pain*, vol. 7, no. 1, pp. 10.
61. Garateix, A., Salceda, E., Menéndez, R., Regalado, E. L., López, O., García, T., Morales R.A., Laguna A., Thomas P. Soto E. (2011). Antinociception produced by *Thalassia testudinum* extract BM-21 is mediated by the inhibition of acid sensing ionic channels by the phenolic compound thalassiolin B. *Molecular pain*, 7, 10.
62. Garza A., López-Ramírez O., Vega R., Soto E. (2010). The aminoglycosides modulate the acid-sensing ionic channel currents in dorsal root ganglion neurons from the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 332, no. 2, pp. 489-499.
63. Gonzales E.B, Kawate T., Gouaux E., (2009). Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors. *Nature*, vol. 460, no. 7255, pp: 599–604.
64. González-Garrido A., Vega R., Mercado F., López I. A., Soto E A. (2015). Acid-Sensing Ion Channels expression, identity and role in the excitability of the cochlear afferent neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 9, pp. 483.
65. Gründer S.; Pusch M. (2015). Biophysical properties of acid-sensing ion channels (ASICs). *Neuropharmacology*, vol. 94, p. 9-18.
66. Gu Q.; Lee L.-Y. (2006). Characterization of acid signaling in rat vagal pulmonary sensory neurons. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 291, no 1, p. L58-L65.
67. Han L. K., Sumiyoshi M., Zheng Y. N., Okuda H., Kimura Y. (2003). Anti-obesity action of *Salix matsudana* leaves (Part 2). Isolation of anti-obesity effectors from polyphenol fractions of *Salix matsudana*. *Phytotherapy Research*, vol. 17, no. 10, pp. 1195-1198.
68. Heppelmann B.; McDougall J. J. (2005). Inhibitory effect of amiloride and gadolinium on fine afferent nerves in the rat knee: evidence of mechanogated ion channels in joints. *Experimental brain research*, vol. 167, no 1, p. 114-118.

69. Hildebrand M. S., de Silva M. G., Klockars T., Rose E., Price M., Smith R. J., McGuirt W.T., Chistopoulos H., Petit C. (2004). Characterisation of DRASIC in the mouse inner ear. *Hearing research*, vol. 190, no 1, p. 149-160.
70. Holland P. R., Akerman S., Andreou A. P., Karsan N., Wemmie J. A., Goadsby P. J. (2012). Acid-sensing ion channel 1: A novel therapeutic target for migraine with aura. *Annals of Neurology*, vol. 72, no 4, p. 559-563.
71. Holzer P. (2015). Acid-sensing ion channels in gastrointestinal function. *Neuropharmacology*, vol. 94, pp. 72-74.
72. Ikeuchi M.; Kolker S. J.; Sluka K. A. (2009). Acid-sensing ion channel 3 expression in mouse knee joint afferents and effects of carrageenan-induced arthritis. *The Journal of Pain*, vol. 10, no 3, p. 336-342.
73. Immke D. C., McCleskey E. W. (2001). Lactate enhances the acid-sensing Na⁺ channel on ischemia-sensing neurons. *Nature neuroscience*, vol. 4, no. 9, pp. 869-870.
74. Iranshahi M., Rezaee R., Parhiz H., Roohbakhsh A., Soltani F. (2015). Protective effects of flavonoids against microbes and toxins: The cases of hesperidin and hesperetin. *Life sciences*, vol. 137, pp. 125-132.
75. J. Jasti, H. Furukawa, E.B. Gonzales, E. Gouaux, (2007). Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature*, vol. 449, no. 7160, pp. 316–23.
76. J.Yagi, H.N. Wenk, L.A. Naves, E.W. McCleskey, (2006). Sustained currents through ASIC3 ion channels at the modest pH changes that occur during myocardial ischemia. *Circulation Research*, vol. 99, no. 5, pp.: 501-509.
77. Jahr H., Van Driel M., Van Osch G. J., Weinans H., Van Leeuwen J. P. (2005). Identification of acid-sensing ion channels in bone. *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 337, no 1, p. 349-354.
78. Jasti J., Furukawa H., Gonzales E.B., Gouaux E., (2007). Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature*, vol. 449, pp.316–23.
79. Jensen H.S., Callø K., Jespersen T., Jensen B.S. y Søren-Peter Olesen, (2005). The KCNQ5 potassium channel from mouse: A broadly expressed M-current like

potassium channel modulated by zinc, pH and volume changes. *Molecular Brain Research*, vol. 139, pp. 52-62.

80. Jensen J. E., Cristofori-Armstrong B., Anangi R., Rosengren K. J., Lau C. H., Mobli M., Brust A., Alewood P.F., King G.F., Rash L.D. (2014). Understanding the molecular basis of toxin promiscuity: the analgesic sea anemone peptide APETx2 interacts with acid-sensing ion channel 3 and hERG channels via overlapping pharmacophores. *Journal of medicinal chemistry*, vol. 57, no 21, p. 9195-9203.
81. Jernigan N. L. (2015). Smooth muscle acid-sensing ion channel 1: pathophysiological implication in hypoxic pulmonary hypertension. *Experimental physiology*, vol. 100, no 2, p. 111-120.
82. Jetti S. K., Swain S. M., Majumder S., Chatterjee S., Poornima V., Bera A. K. (2010). Evaluation of the role of nitric oxide in acid sensing ion channel mediated cell death. *Nitric Oxide*, vol. 22, no. 3, pp. 213-219.
83. Jiang Q., Inoue K., Wu X., Papasian, C. J., Wang J. Q., Xiong Z. G., Chu X. P. (2011). Cysteine 149 in the extracellular finger domain of acid-sensing ion channel 1b subunit is critical for zinc-mediated inhibition. *Neuroscience*, vol. 193, pp. 89-99.
84. Jing L.; Chu X.-P.; Zha X.-M. (2013). Three distinct motifs within the C-terminus of acid-sensing ion channel 1a regulate its surface trafficking. *Neuroscience*, vol. 247, p. 321-327.
85. Johnson M. B., Jin K., Minami M., Chen D., Simon R. P. (2001). Global ischemia induces expression of acid-sensing ion channel 2a in rat brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, vol. 21, no 6, p. 734-740.
86. Jones Q. R., Warford J., Rupasinghe H. V., Robertson G. S. (2012). Target-based selection of flavonoids for neurodegenerative disorders. *Trends in pharmacological sciences*, vol. 33, no. 11, pp. 602-610.
87. Jovov, B., Tousson, A., McMahon, L. L., & Benos, D. J. (2003). Immunolocalization of the acid-sensing ion channel 2a in the rat cerebellum. *Histochemistry and cell biology*, vol. 119, no 6, p. 437-446.
88. Katyal P., Bhardwaj N., Khajuria R. (2014). Flavonoids and their therapeutic potential as anticancer agents; biosynthesis, metabolism and regulation. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 3, no. 6, pp. 2188-2216.

89. Kehl S.J., Eduljee C., Kwan D.C.H., Zhang S. y Fedida D., (2002). Molecular determinants of the inhibition of human Kv 1.5 potassium currents by external protons and Zn⁺⁺. *Journal of Physiology*, vol. 541, pp. 9-24.
90. Kellenberger S., Gautschi I., Schild L. (2003). Mutations in the epithelial Na⁺ channel ENaC outer pore disrupt amiloride block by increasing its dissociation rate. *Molecular pharmacology*, vol. 64, no. 4, pp. 848-856.
91. Kellenberger S., Schild L. (2002). Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiological reviews*, vol. 82, no 3, p. 735-767.
92. Krishek B.J. y Smart T.G., (2001). Proton sensitivity of a rat cerebellar granule cell GABAA receptors: dependence on neuronal development. *Journal of Physiology*, vol. 530, pp. 219-233.
93. Krishtal O. (2003). The ASICs: signaling molecules? modulators?. *Trends in neurosciences*, vol. 26, no 9, p. 477-483.
94. Kumar S., Pandey A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, vol. 2013.
95. Kusama N., Gautam, M., Harding A. M. S., Snyder P. M., Benson C. J. (2013). Acid-sensing ion channels (ASICs) are differentially modulated by anions dependent on their subunit composition. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 304, no. 1, pp. C89-C101.
96. Kweon H.-J.; Suh B.-C. (2013). Acid-sensing ion channels (ASICs): therapeutic targets for neurological diseases and their regulation. *BMB reports*, vol. 46, no 6, p. 295-304.
97. Le Marchand L. (2002). Cancer preventive effects of flavonoids—a review. *Biomedicine & pharmacotherapy*, vol. 56, no. 6, pp. 296-301.
98. Lei Z., Li X., Wang G., Fei J., Meng T., Zhang X., Li, J. (2014). Inhibition of acid-sensing ion channel currents by propofol in rat dorsal root ganglion neurons. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, vol. 41, no. 4, pp. 295-300.
99. Leng T., Lin J., Cottrell J. E., Xiong Z. G. (2013). Subunit and frequency-dependent inhibition of acid sensing ion channels by local anesthetic tetracaine. *Molecular pain*, vol. 9, no. 1, pp. 27.

100. Levites Y., Weinreb O., Maor G., Youdim M. B., Mandel S. (2001). Green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration. *Journal of neurochemistry*, vol. 78, no. 5, pp. 1073-1082.
101. Leyva-López N., Gutierrez-Grijalva E. P., Ambriz-Perez D. L., & Heredia, J. B. (2016). Flavonoids as cytokine modulators: a possible therapy for inflammation-related diseases. *International journal of molecular sciences*, vol. 17, no. 6, pp. 921.
102. Li W. G., Yu Y., Zhang Z. D., Cao, H., Xu T. L. (2010). ASIC3 channels integrate agmatine and multiple inflammatory signals through the nonproton ligand sensing domain. *Molecular pain*, vol. 6, no. 1, pp. 88.
103. Li W.-G., Xu T.-L. (2010). ASIC3 channels in multimodal sensory perception. *ACS chemical neuroscience*, vol. 2, no 1, p. 26-37.
104. Li X., Fei J., Lei Z., Liu K., Wu J., Meng T., Li J. (2014). Chloroquine impairs visual transduction via modulation of acid sensing ion channel 1a. *Toxicology letters*, vol. 228, no. 3, pp. 200-206.
105. Lin J., Chu X., Maysami S., Li M., Si H., Cottrell J. E., Xiong Z. (2011). Inhibition of acid sensing ion channel currents by lidocaine in cultured mouse cortical neurons. *Anesthesia and analgesia*, vol. 112, no. 4, pp. 977.
106. Lin S. H., Chien Y. C., Chiang W. W., Liu Y. Z., Lien C. C., Chen C. C. (2015). Genetic mapping of ASIC4 and contrasting phenotype to ASIC1a in modulating innate fear and anxiety. *European Journal of Neuroscience*, vol. 41, no 12, p. 1553-1568.
107. Lingueglia E. (2007). Acid-sensing ion channels in sensory perception. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no 24, p. 17325-17329.
108. Lingueglia E., Deval E., Lazdunski M. (2006). FMRFamide-gated sodium channel and ASIC channels: a new class of ionotropic receptors for FMRFamide and related peptides. *Peptides*, vol. 27, no. 5, pp. 1138-1152.
109. Liu Y. Q., Qiu F., Qiu C. Y., Cai Q., Zou P., Wu H., Hu W. P. (2012). Cannabinoids inhibit acid-sensing ion channel currents in rat dorsal root ganglion neurons. *PLoS one*, vol. 7, no. 9, pp. e45531.

- 110.** Llanio M., Fernández M. D., Cabrera B., Bermejo P., Abad M. J., Payá M., Alcaraz M. J. (2006). The marine plant *thalassia testudinum* possesses anti-inflammatory and analgesic properties. *Pharmacologyonline*, vol. 3, pp.597-600.
- 111.** M. Hesselager, D.B. Timmermann, P.K. Ahring, (2004) pH dependency and desensitization kinetics of heterologously expressed combinations of acid sensing ion channel subunits. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 12, pp.: 11006-11015.
- 112.** Magnotta V.A., Heo H. Y., Dlouh, B. J., Dahdaleh N. S., Follmer R. L., Thedens D. R. Welshc M.J., Wemmieb J.A., (2012) Detecting activity-evoked pH changes in human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, no 21, p. 8270-8273.
- 113.** Mamet J., Baron A., Lazdunski M., Voille, N. (2002). Proinflammatory mediators, stimulators of sensory neuron excitability via the expression of acid-sensing ion channels. *Journal of Neuroscience*, vol. 22, no. 24, pp. 10662-10670.
- 114.** Mamet, J., Lazdunski M., Voilley N. (2003). How nerve growth factor drives physiological and inflammatory expressions of acid-sensing ion channel 3 in sensory neurons. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 49, pp. 48907-48913.
- 115.** Mango D., Barbato G., Piccirilli S., Panico M. B., Feligioni M., Schepisi C., Pizzi, M. (2014). Electrophysiological and metabolic effects of CHF5074 in the hippocampus: Protection against in vitro ischemia. *Pharmacological research*, vol. 81, pp. 83-90.
- 116.** Mc Donald J.W., Bhattacharyya T., Sensi S.L., Lobner D., Ying H.S., Canzoniero L.M.T. y Choi D.W., (1998). Extracellular acidity potentiates AMPA receptor-mediated cortical neuronal death. *Journal of Neuroscience*, vol. 18, pp. 6290-6299.
- 117.** Mehla R., Bivalkar-Mehla S., Chauhan A. (2011). A flavonoid, luteolin, cripples HIV-1 by abrogation of tat function. *PLoS One*, vol. 6, no. 11, pp. e27915.
- 118.** Meng Q. Y., Wang W., Chen X. N., Xu T. L., Zhou J. N. (2009). Distribution of acid-sensing ion channel 3 in the rat hypothalamus. *Neuroscience*, vol. 159, no 3, p. 1126-1134.
- 119.** Mercado F., Almanza A., Simón-Arceo K., López O., Vega R., Coffeen U., Contreras B., Soto E., Pellicer F. (2015). Inhibition of peripheral nociceptors by

aminoglycosides produces analgesia in inflammatory pain models in the rat. *Inflammation*, vol. 38, no. 2, pp. 649-657.

120. Mercado F., López I. A., Acuna D., Vega R., Soto E. (2006). Acid-sensing ionic channels in the rat vestibular endorgans and ganglia. *Journal of neurophysiology*, vol. 96, no 3, p. 1615-1624.
121. Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, vol. 52, no. 4, pp. 673-751.
122. Mishra B., Priyadarsini K. I., Kumar M. S., Unnikrishnan M. K., Mohan H. (2003). Effect of O-glycosilation on the antioxidant activity and free radical reactions of a plant flavonoid, chrysoeriol. *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 11, 2677-2685.
123. Molliver D. C., Immke D. C., Fierro L., Paré M., Rice F. L., McCleskey E (2005). ASIC3, an acid-sensing ion channel, is expressed in metaboreceptive sensory neurons. *Molecular pain*, vol. 1, no 1, p. 35.
124. Mukhopadhyay M., Singh A., Sachchidanand S., Bera A.K. (2017). Quercetin inhibits acid-sensing ion channels through a putative binding site in the central vestibular region. *Neuroscience*, vol. 348, pp. 264-272.
125. Munro G., Christensen J. K., Erichsen H. K., Dyhring T., Demnitz J., Dam E., Ahring P. K. (2016). NS383 Selectively Inhibits Acid-Sensing Ion Channels Containing 1a and 3 Subunits to Reverse Inflammatory and Neuropathic Hyperalgesia in Rats. *CNS neuroscience & therapeutics*, vol. 22, no. 2, pp. 135-145.
126. Nagaeva E. I., Potapieva N. N., Tikhonov, D. B. (2015). The effect of hydrophobic monoamines on acid-sensing ion channels ASIC1B. *Acta Naturae (англоязычная версия)*, vol. 7, no. 2, pp.25.
127. Nijveldt R. J., Van Nood E. L. S., Van Hoorn D. E., Boelens P. G., Van Norren K., Van Leeuwen P. A. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 74, no. 4, pp. 418-425.
128. Nijveldt R. J., Van Nood E. L. S., Van Hoorn D. E., Boelens P. G., Van Norren K., Van Leeuwen P. A. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action

and potential applications. *The American journal of clinical nutrition*, vol. 74, no. 4, pp. 418-425.

- 129.** Osmakov D. I., Kozlov S. A., Andreev Y. A., Koshelev S. G., Sanamyan N. P., Sanamyan K. E., Arseniev, A. S. (2013). Sea anemone peptide with uncommon β -hairpin structure inhibits acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) and reveals analgesic activity. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, no. 32, pp. 23116-23127.
- 130.** Page A. J., Brierley S. M., Martin C. M., Price M. P., Symonds E., Butler R., Wemmie J.A., Blackshaw L.A. (2005). Different contributions of ASIC channels 1a, 2, and 3 in gastrointestinal mechanosensory function. *Gut*, vol. 54, no 10, p. 1408-1415.
- 131.** Pandey A.K., Hazari P.P., Patnaik R., Mishra, A. K. (2011). The role of ASIC1a in neuroprotection elicited by quercetin in focal cerebral ischemia. *Brain research*, vol.1383, pp. 289-299.
- 132.** Pannala A. S., Chan T. S., O'Brien P. J., Rice-Evans C. A. (2001). Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 282, no. 5, pp. 1161-1168.
- 133.** Parton R.G., Dotti C.G., Bacallao R., Kurtz I., Simons K., Prydz, K. (1991). pH-induced microtubule-dependent redistribution of late endosomes in neuronal and epithelial cells. *Journal of Cell Biology*, vol. 113, pp. 261–274.
- 134.** Paukert M., Chen, X., Polleichtner, G., Schindelin, H., Gründer, S. (2008). Candidate amino acids involved in H⁺ gating of acid-sensing ion channel 1a. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no 1, p. 572-581.
- 135.** Pedro A. C., Granato D., Rosso N. D. (2016). Extraction of anthocyanins and polyphenols from black rice (*Oryza sativa* L.) by modeling and assessing their reversibility and stability. *Food chemistry*, vol. 191, pp. 12-20.
- 136.** Peng B. G., Ahmad S., Chen S., Chen P., Price M. P., Lin X. (2004). Acid-sensing ion channel 2 contributes a major component to acid-evoked excitatory responses in spiral ganglion neurons and plays a role in noise susceptibility of mice. *Journal of Neuroscience*, vol. 24, no 45, p. 10167-10175.
- 137.** Pidoplichko V. I.; Dani J. A. (2006). Acid-sensitive ionic channels in midbrain dopamine neurons are sensitive to ammonium, which may contribute to

hyperammonemia damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, no 30, p. 11376-11380.

138. Price M. P., Gong H., Parsons M. G., Kundert J. R., Reznikov L. R., Bernardinelli L., Chaloner K., Buchanan G.F., Wemmier J.A., Richerson G.B., Cassell M.D. (2014) Localization and behaviors in null mice suggest that ASIC1 and ASIC2 modulate responses to aversive stimuli. *Genes, Brain and Behavior*, vol. 13, no 2, p. 179-194.
139. Price M. P., McIlwrath S. L., Xie J., Cheng C., Qiao J., Tarr D. E., Sluka K.A., Brennan T.J., Lewin G.R., Welsh M.J. (2001). The DRASIC cation channel contributes to the detection of cutaneous touch and acid stimuli in mice. *Neuron*, vol. 32, no 6, p. 1071-1083.
140. Qiu F., Liu T. T., Qu Z. W., Qiu C. Y., Yang Z., Hu W. P. (2014). Gastrodin inhibits the activity of acid-sensing ion channels in rat primary sensory neurons. *European journal of pharmacology*, vol. 731, pp. 50-57.
141. Qu Z. W., Liu T. T., Qiu C. Y., Li J. D., Hu W. P. (2014). Inhibition of acid-sensing ion channels by chlorogenic acid in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience letters*, vol. 567, pp. 35-39.
142. Rahman T.; Smith E. S.J. (2014). In silico assessment of interaction of sea anemone toxin APETx2 and acid sensing ion channel 3. *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 450, no 1, p. 384-389.
143. Ravishankar D., Rajora A. K., Greco F., & Osborn H. M. (2013). Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *The international journal of biochemistry & cell biology*, vol. 45, no. 12, pp. 2821-2831.
144. Regalado E. L., Menendez R., Valdés O., Morales R. A., Laguna A., Thomas, O. P., Kijjoa A. (2012). Phytochemical analysis and antioxidant capacity of BM-21, a bioactive extract rich in polyphenolic metabolites from the sea Grass *Thalassia testudinum*. *Natural product communications*, vol. 7, no. 1, pp. 47-50.
145. Regalado E. L., Rodríguez M., Menéndez R., Concepción Á. A., Nogueiras C., Laguna A., Hernandez Y. (2009). Repair of UVB-damaged skin by the antioxidant sulphated flavone glycoside thalassiolin B isolated from the marine plant *Thalassia testudinum* Banks ex König. *Marine Biotechnology*, vol. 11, no. 1, pp. 74-80.

146. Regalado E. L., Rodríguez M., Menéndez R., Fernandez X., Hernández I., Morales, R. A., Laguna A. (2011). Photoprotecting action and phytochemical analysis of a multiple radical scavenger lipophilic fraction obtained from the leaf of the seagrass *Thalassia testudinum*. *Photochemistry and photobiology*, vol. 87, no. 5, pp. 1058-1066.
147. Rendeiro C., Rhodes J. S., Spencer J. P. (2015). The mechanisms of action of flavonoids in the brain: direct versus indirect effects. *Neurochemistry international*, vol. 89, pp. 126-139.
148. Rodeiro I., Donato M. T., Martínez I., Hernández I., Garrido G., González-Lavaut J. A., Gómez-Lechón M. J. (2008). Potential hepatoprotective effects of new Cuban natural products in rat hepatocytes culture. *Toxicology in vitro*, vol. 22, no. 5, pp. 1242-1249.
149. Rodríguez A. A., Salceda E., Garateix A. G., Zaharenko A. J., Peigneur S., López, O., Pons T., Richardson M., Díaz M., Hernández Y., Ständker L., Tytgat J., Soto E. (2014). A novel sea anemone peptide that inhibits acid-sensing ion channels. *Peptides*, vol. 53, pp. 3-12.
150. Rowley D. C., Hansen M. S., Rhodes D., Sotriffer C. A., Ni, H., McCammon J. A., Fenical, W. (2002). Thalassiolins A–C: new marine-derived inhibitors of HIV cDNA integrase. *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 10, no. 11, pp. 3619-3625.
151. Seleem D., Pardi V., Murata R.M. (2017). Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-*Candida albicans* activity in vitro. *Archives of oral biology*, vol. 76, p. 76-83.
152. Shah M.J., Meis S., Munsch T., Pape H.C., (2001). Modulation by extracellular pH of low- and high-voltage-activated calcium currents of rat thalamic relay neurons. *Journal of Neurophysiology*; vol. 85: pp. 1051-8.
153. Sharma H., Patil S., Sanchez, T. W., Neamati N., Schinazi R. F., Buolamwini, J. K. (2011). Synthesis, biological evaluation and 3D-QSAR studies of 3-keto salicylic acid chalcones and related amides as novel HIV-1 integrase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 19, no. 6, pp. 2030-2045.

154. Sherwood T. W., Askwith C. C. (2009). Dynorphin opioid peptides enhance acid-sensing ion channel 1a activity and acidosis-induced neuronal death. *Journal of Neuroscience*, vol. 29, no. 45, pp. 14371-14380.
155. Sherwood T. W., Lee K. G., Gormley M. G., Askwith C. C. (2011). Heteromeric acid-sensing ion channels (ASICs) composed of ASIC2b and ASIC1a display novel channel properties and contribute to acidosis-induced neuronal death. *Journal of Neuroscience*, vol. 31, no. 26, pp. 9723-9734.
156. Sherwood T.W., Frey E.N., Askwith, C.C., (2012). Structure and activity of the acid-sensing ion channels. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 303, pp. C699–C710.
157. Sluka K. A.; Winter O. C.; Wemmie J. A. (2009). Acid-sensing ion channels: A new target for pain and CNS diseases. *Current opinion in drug discovery & development*, vol. 12, no 5, p. 693.
158. Smith E. S., Cadiou H., McNaughton P. A. (2007). Arachidonic acid potentiates acid-sensing ion channels in rat sensory neurons by a direct action. *Neuroscience*, vol. 145, no. 2, pp. 686-698.
159. Spencer J. P. (2009). The impact of flavonoids on memory: physiological and molecular considerations. *Chemical Society Reviews*, vol. 38, no. 4, pp. 1152-1161.
160. Spencer J. P. (2010). Beyond antioxidants: the cellular and molecular interactions of flavonoids and how these underpin their actions on the brain. *Proceedings of the Nutrition Society*, vol. 69, no. 02, pp. 244-260.
161. Spray D.C., Harris A.L., Bennett M.V.L., (1981) Gap junctional conductance is a simple and sensitive function of intracellular pH. *Science*, vol.211, pp.13.
162. Springauf A.; Gründer S. (2010). An acid-sensing ion channel from shark (*Squalus acanthias*) mediates transient and sustained responses to protons. *The Journal of physiology*, vol. 588, no 5, p. 809-820.
163. Stoop R., Surprenant A., North R.A., (1997). Different sensitivities to pH of ATP-induced currents at four cloned P2X receptors. *Journal of Neurophysiology*, vol. 78, pp. 1837-1840.

- 164.** Sun X., Cao Y. B., Hu L. F., Yang Y. P., Li J., Wang F., Liu C. F. (2011). ASICs mediate the modulatory effect by paeoniflorin on alpha-synuclein autophagic degradation. *Brain research*, vol. 1396, pp. 77-87.
- 165.** Sutherland S. P., Benson C. J., Adelman J. P., McCleskey E. W. (2001). Acid-sensing ion channel 3 matches the acid-gated current in cardiac ischemia-sensing neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 98, no 2, p. 711-716.
- 166.** Takemura H., Uchiyama H., Ohura T., Sakakibara H., Kuruto R., Amagai T., Shimoi K. (2010). A methoxyflavonoid, chrysoeriol, selectively inhibits the formation of a carcinogenic estrogen metabolite in MCF-7 breast cancer cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 118, no. 1, pp. 70-76.
- 167.** Traynelis S.F. y Cull-Candy S.G., (1990). Proton Inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar neurons. *Nature*, vol. 345, pp. 347-350.
- 168.** Tuñón, M. J., Garcia-Mediavilla M. V., Sanchez-Campos S., Gonzalez-Gallego J. (2009). Potential of flavonoids as anti-inflammatory agents: modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways. *Current drug metabolism*, vol. 10, no. 3, pp. 256-271.
- 169.** Ugawa S. (2003). Identification of sour-taste receptor genes. *Anatomical Science International*, vol. 78, no 4, p. 205-210.
- 170.** Ugawa S., Ishida Y., Ueda T., Inoue K., Nagao M., Shimada, S. (2007). Nafamostat mesilate reversibly blocks acid-sensing ion channel currents. *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 363, no. 1, pp. 203-208.
- 171.** Ugawa S., Ueda T., Yamamura H., Shimada S. (2005). In situ hybridization evidence for the coexistence of ASIC and TRPV1 within rat single sensory neurons. *Molecular brain research*, vol. 136, no 1, p. 125-133.
- 172.** Van Bemmelen, M. X., Huser, D., Gautschi, I., Schild, L. (2015). The human acid-sensing ion channel ASIC1a: evidence for a homotetrameric assembly state at the cell surface. *PLoS one*, vol. 10, no 8, p. e0135191.
- 173.** Veitch N. C., Grayer R. J. (2011). Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. *Natural product reports*, vol. 28, no.10, pp.1626-1695.

- 174.** Vergo S., Craner M. J., Etzensperger R., Attfield K., Friese M. A., Newcombe J., Esiri M., Fugger L. (2011). Acid-sensing ion channel 1 is involved in both axonal injury and demyelination in multiple sclerosis and its animal model. *Brain*, vol. 134, no 2, p. 571-584.
- 175.** Vick J. S., Askwith C. C. (2015). ASICs and neuropeptides. *Neuropharmacology*, vol. 94, pp. 36-41.
- 176.** Vila-Carriles W. H., Kovacs G. G., Jovov B., Zhou Z. H., Pahwa A. K., Colby G., Esimai O., Gillespie G.Y., Mapstone T.B., Markert J., Fuller C. M., Bubien J.K., Benos D.J. (2006). Surface expression of ASIC2 inhibits the amiloride-sensitive current and migration of glioma cells. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no 28, p. 19220-19232.
- 177.** Voilley N. (2004). Acid-sensing ion channels (ASICs): New targets for the analgesic effects of Non-Steroid Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs). *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*, vol. 3, no 1, p. 71-79.
- 178.** Voilley N., de Weille J., Mamet J., Lazdunski M. (2001). Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. *Journal of Neuroscience*, vol. 21, no. 20, pp. 8026-8033.
- 179.** Walder R. Y., Rasmussen L. A., Rainier J. D., Light A. R., Wemmie J. A., Sluka, K. A. (2010). ASIC1 and ASIC3 play different roles in the development of hyperalgesia after inflammatory muscle injury. *The Journal of pain*, vol. 11, no 3, p. 210-218.
- 180.** Waldmann R., Champigny G., Bassilana F., Heurteaux C., Lazdunski, M. (1997). A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature*, vol. 386, no. 6621, pp. 173.
- 181.** Wasowski C., Marder M. (2012). Flavonoids as GABAA receptor ligands: the whole story? *Journal of experimental pharmacology*, vol. 4, pp. 9.
- 182.** Wemmie J. A., Chen J., Askwith C. C., Hruska-Hageman A. M., Price M. P., Nolan B. C., Yoder P.G., Lamani E., Hoshi T., Freeman Jr. J.H. (2002). The acid activated ion channel ASIC contributes to synaptic plasticity, learning, and memory. *Neuron*, vol. 34, no. 3, pp. 463-477.

- 183.** Wemmie J. A., Coryell M. W., Askwith C. C., Lamani E., Leonard A. S., Sigmund C. D., Welsh M. J. (2004). Overexpression of acid-sensing ion channel 1a in transgenic mice increases acquired fear-related behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no 10, p. 3621-3626.
- 184.** Wemmie J. A.; Taugher R. J.; Kreple C. J. (2013). Acid-sensing ion channels in pain and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 14, no 7, p. 461-471.
- 185.** WEMMIE, John A., et al. Acid-sensing ion channel 1 is localized in brain regions with high synaptic density and contributes to fear conditioning. *Journal of Neuroscience*, 2003, vol. 23, no 13, p. 5496-5502.
- 186.** Williams C. A., Grayer R. J. (2004). Anthocyanins and other flavonoids. *Natural product reports*, vol. 21, no. 4, pp. 539-573.
- 187.** Williams R. J., Spencer J. P. (2012). Flavonoids, cognition, and dementia: actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 52, no. 1, pp. 35-45.
- 188.** Wu F. R., Pan C. X., Rong C., Xia Q., Yuan F. L., Tang J., Wang X.-Y., Wang N., Ni, W.-L., Chen F.-H. (2014). Inhibition of acid-sensing ion channel 1a in hepatic stellate cells attenuates PDGF-induced activation of HSCs through MAPK pathway. *Molecular and cellular biochemistry*, vol. 395, no 1-2, p. 199-209.
- 189.** Wu H., Wang C., Liu B., Li H., Zhang Y., Dong, S., Gao G., Zhang H. (2016). Altered Expression Pattern of Acid-Sensing Ion Channel Isoforms in Piriform Cortex After Seizures. *Molecular neurobiology*, vol. 53, no 3, p. 1782-1793.
- 190.** Wu W. L., Cheng C. F., Sun W. H., Wong C. W., Che, C. C. (2012). Targeting ASIC3 for pain, anxiety, and insulin resistance. *Pharmacology & therapeutics*, vol. 134, no. 2, pp. 127-138.
- 191.** Xiong Z. G., Pignataro G., Li, M., Chang S. Y., Simon R. P. (2008). Acid-sensing ion channels (ASICs) as pharmacological targets for neurodegenerative diseases. *Current opinion in pharmacology*, vol. 8, no 1, p. 25-32.
- 192.** Xiong Z. G., Zhu X. M., Chu X. P., Minami M., Hey J., Wei W. L., McDonald J.F., Wemmie J.A., Price M., Welsh M.J. (2004). Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels. *Cell*, vol. 118, no 6, p. 687-698.

- 193.** Yagi J., Wenk H. N., Naves L. A., McCleskey E. W. (2006). Sustained currents through ASIC3 ion channels at the modest pH changes that occur during myocardial ischemia. *Circulation research*, vol. 99, no 5, p. 501-509.
- 194.** Yan J., Edelmayer R. M., Wei X., De Felice M., Porreca F., Dussor G. (2011). Dural afferents express acid-sensing ion channels: a role for decreased meningeal pH in migraine headache. *PAIN*, vol. 152, no 1, p. 106-113.
- 195.** Yang Y., Zhou X., Xiao M., Hong Z., Gong Q., Jiang L., Zhou J. (2010). Discovery of chrysoeriol, a PI3K-AKT-mTOR pathway inhibitor with potent antitumor activity against human multiple myeloma cells in vitro. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*, vol. 30, no. 6, pp. 734-740.
- 196.** Ye J. H., Gao J., Wu Y. N., Hu Y. J., Zhang C. P., Xu T. L. (2007). Identification of acid-sensing ion channels in adenoid cystic carcinomas. *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 355, no 4, p. 986-992.
- 197.** Yiangou Y., Facer P., Smith J.A., Sangameswaran L., Eglen R., Birch R., Knowles C., Williams N., Anand P. (2001). Increased acid-sensing ion channel ASIC-3 in inflamed human intestine. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, vol. 13, no. 8, pp. 891-896.
- 198.** Yu X. W., Hu Z. L., Ni M., Fang P., Zhang P. W., Shu Q., Fan H., Zhou H.-Y., Ni L., Zhu L-Q., Chen J.-G., Wang F. (2015). Acid-sensing ion channels promote the inflammation and migration of cultured rat microglia. *Glia*, vol. 63, no. 3, pp. 483-496.
- 199.** Yu Y., Chen Z., Li W. G., Cao H., Feng E. G., Yu F., Liu H., Jiang H., Xu T. (2010). A nonproton ligand sensor in the acid-sensing ion channel. *Neuron*, vol. 68, no. 1, pp. 61-72.
- 200.** Zeng X., Shi J., Zhao M., Chen Q., Wang L., Jiang H., Liu, Z. (2016). Regioselective Glucuronidation of Diosmetin and Chrysoeriol by the Interplay of Glucuronidation and Transport in UGT1A9-Overexpressing HeLa Cells. *PLoS one*, vol. 11, no. 11, pp. e0166239.
- 201.** Zha X. M., Wang R., Collier D. M., Snyder P. M., Wemmie J. A., Welsh, M. J. (2009). Oxidant regulated inter-subunit disulfide bond formation between ASIC1a subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, no. 9, pp. 3573-3578.

- 202.** Zha X. M., Wemmie J. A., Green S. H., Welsh M. J. (2006). Acid-sensing ion channel 1a is a postsynaptic proton receptor that affects the density of dendritic spines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, no 44, p. 16556-16561.
- 203.** Zhang Z. G., Zhang X. L., Wang X. Y., Luo Z. R., Song J. C. (2015). Inhibition of acid sensing ion channel by ligustrazine on angina model in rat. *American journal of translational research*, vol. 7, no. 10, pp. 1798.
- 204.** Zhou Y. X., Zhang H., Peng C. (2014). Puerarin: a review of pharmacological effects. *Phytotherapy Research*, vol. 28, no. 7, pp. 961-975.
- 205.** Ziemann A. E., Allen J. E., Dahdaleh N. S., Drebot I. I., Coryell M. W., Wunsch A. M., Lynch C.M., Faraci F.M., Howard III M.A. (2009). The amygdala is a chemosensor that detects carbon dioxide and acidosis to elicit fear behavior. *Cell*, vol. 139, no 5, p. 1012-1021.
- 206.** Ziemann A. E., Schnizler M. K., Albert G. W., Severson M. A., Howard III M. A., Welsh M. J., Wemmie J. A. (2008). Seizure termination by acidosis depends on ASIC1a. *Nature neuroscience*, vol. 11, no 7, p. 816-822.