



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA**

**EFFECTO DEL CANNABINIOIDE SINTÉTICO ARAQUIDONIL 2-CLOROETILAMIDA (ACEA)  
SOBRE LAS CORRIENTES DE SODIO DEL CANAL  $\text{Na}_v1.9 + \beta 1$  EXPRESADO EN LÍNEA  
CELULAR CHO-K1**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS**

**PRESENTA**

**ING. MARIO MARCHESE ROJAS**

**ASESOR EXPERTO: DR. EDUARDO M. SALINAS STEFANÓN**

**Laboratorio de Biofísica Cardíaca, Instituto de Fisiología, BUAP**

**PUEBLA, PUE. A JUNIO DE 2020**

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	iii
ÍNDICE DE TABLAS .....	iii
ABREVIATURAS.....	iv
RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
ANTECEDENTES GENERALES. ....	7
Canales de sodio controlados por voltaje: Estructura, función y clasificación. ....	7
Características biofísicas del canal Na <sub>v</sub> 1.9 .....	11
Sistema endocannabinoide .....	12
Receptores cannabinoides .....	12
Ligandos cannabinoides. ....	15
Transducción de señales .....	20
ANTECEDENTES PARTICULARES. ....	23
JUSTIFICACIÓN. ....	25
HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVOS.....	25
Objetivos Generales. ....	25
Objetivos Específicos.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
Descripción General .....	26
Técnicas y procedimientos.....	26
Transformación de bacterias E. coli con el cDNA del canal hNav 1.9 .....	26
Amplificación y purificación del cDNA del canal hNa <sub>v</sub> 1.9, subunidad β1 y proteína verde fluorescente (pEGFP).....	27
Preparación de medio de cultivo LB.....	28
Precultivo .....	28
Cultivo masivo .....	28
Purificación del cDNA.....	29

Transfección del canal hNav1.9 + $\beta$ 1 en la línea celular CHO-K1.....	30
Registro electrofisiológico.....	31
RESULTADOS .....	37
Bloqueo dependiente de concentración.....	37
Relación corriente contra voltaje.....	40
Bloqueo dependiente de voltaje.....	41
Inactivación de estado estable y conductancia. ....	42
Corriente de ventana. ....	44
Cinética de activación. ....	46
Cinética de inactivación. ....	48
Curso temporal de la recuperación de la inactivación.....	49
Bloqueo dependiente de uso y frecuencia. ....	50
Curso temporal de la inhibición de la corriente de sodio. ....	52
DISCUSIÓN.....	54
CONCLUSIONES .....	58
ANEXO A. Alineamiento del gen SCN11A con los fragmentos secuenciados. ....	59
BIBLIOGRAFÍA.....	62

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Subunidades $\alpha$ y $\beta$ del canal de sodio activado por voltaje .....	8
Figura 2. Estructura de los receptores cannabinoides .....	13
Figura 3. Estructura química de los principales endocannabinoides .....	16
Figura 4. Esquema de la síntesis y degradación de AEA y 2-AG .....	17
Figura 5. Estructura química de los principales fitocannabinoides .....	18
Figura 6. Señalización clásica de los receptores a cannabinoides CB <sub>1</sub> y CB <sub>2</sub> .....	21

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Relación corriente contra voltaje a diferentes concentraciones de ACEA .....	38
Gráfica 2. Curva dosis-efecto .....	39
Gráfica 3. Efecto en la corriente de sodio pico en función de la concentración de ACEA .....	39
Gráfica 4. Relación corriente contra voltaje (control y 12 $\mu$ M de ACEA) .....	40
Gráfica 5. Bloqueo dependiente de voltaje .....	41
Gráfica 6. Curvas de inactivación de estado estable y conductancia .....	43
Gráfica 7. Área bajo la curva del traslape de las curvas de activación e inactivación .....	46
Gráfica 8. Cinética de activación .....	47
Gráfica 9. Cinética de inactivación. ....	48
Gráfica 10. Recuperación de la inactivación .....	49
Gráfica 11. Dependencia de uso y frecuencia .....	51
Gráfica 12. Comparación del efecto de bloqueo a diferentes frecuencias de estimulación .....	52
Gráfica 13. Curso temporal de la instalación y disociación del fármaco .....	53

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación farmacológica de los Nav's. ....	9
Tabla 2. Distribución de los subtipos de canales de sodio y su efecto. ....	11
Tabla 3. Porcentaje de bloqueo en relación con la concentración de ACEA. ....	37
Tabla 4. Parámetros de inactivación de estado estable y conductancia .....	43
Tabla 5. Recuperación de la inactivación. ....	50

## ABREVIATURAS

2-AG	2-araquidonil glicerol
AC	adenilato ciclasa
ACEA	araquidonil-2-cloroetilamida
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
AEA	anandamida o araquidonoil etanolamida
Ala/A	alanina
AMPc	adenosina-3', 5' monofosfato cíclico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
Asp/D	aspartato
ATP	adenosina trifosfato
CBD	cannabidiol
CBN	cannabinol
CHO	células de ovario de hámster chino
DAG	diacilglicerol
DEKA	anillo del filtro de selectividad (aspartato, glutamato, lisina, alanina)
DI	Dominio 1
DII	Dominio 2
DIII	Dominio 3
DIV	Dominio 4
DNA	ácido desoxirribonucleico
EC <sub>50</sub>	concentración efectiva al 50%
E <sub>m</sub>	potencial de membrana
E <sub>Na<sup>+</sup></sub>	potencial de equilibrio de Sodio
ERK	quinasa regulada por señales extracelulares
FAAH	amido hidrolasa de ácidos grasos
FBS	suero fetal bovino
Glu/E	glutamato
g <sub>Na<sup>+</sup></sub>	conductancia de membrana al ion sodio
HEK-293t	Human Embryonic, Kidney
I <sub>Na<sup>+</sup></sub>	corriente de sodio
KDa	kilodalton
Lys/K	lisina
MAGL	monoacilglicerol lipasa
MAPK	proteína quinasa activada por mitógeno
ml	mililitro
Nav	canal de sodio voltaje dependiente
NO	óxido nítrico

PD	dominio del poro
PEA	palmitoiletanolamida
pEGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein plasmid
PI3K	fosfatidil-inositol 3 quinasa
PKA	proteína quinasa A
PLC	fosfolipasa C
PLD	fosfolipasa D
PMR	potencial de membrana en reposo
S1	Segmento 1
S2	Segmento 2
S3	Segmento 3
S4	Segmento 4
S5	Segmento 5
S6	Segmento 6
SF	filtro de selectividad
SNC	sistema nervioso central
SNC	sistema nervioso central
SNP	sistema nervioso periférico
SNP	sistema nervioso periférico
TRP	canales receptores de potenciales transitorios
TRPV <sub>1</sub>	canales receptores de potenciales transitorios vaniloide tipo 1
TTX	tetrodotoxina
$\Delta^8$ -THC	$\Delta^8$ -tetrahidrocannabinol
$\Delta^9$ -THC	$\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol
$\mu$ l	microlitro

## RESUMEN

Los cannabinoides han demostrado regular y ejercer efectos sobre múltiples funciones fisiológicas. Uno de ellos es el efecto analgésico, el cual ha despertado mucho interés para identificar nuevas terapias farmacológicas en el manejo del dolor refractario a otros tratamientos. Sin embargo, el mecanismo que gobierna el efecto analgésico de los cannabinoides aún no está completamente dilucidado. Se piensa que los canales de sodio dependientes de voltaje juegan un papel muy importante en el dolor inflamatorio y neuropático, por lo que resulta interesante conocer el efecto que pudieran ejercer los cannabinoides sobre estos canales. En el presente trabajo, se investigó el efecto de un cannabinoide sintético, la araquidonil cloro etilamida (ACEA), cuya estructura química es muy similar a la anandamida, un cannabinoide endógeno que ha mostrado reducir las corrientes de sodio en los canales de sodio voltaje dependientes. En este caso, se evaluaron los efectos de este fármaco sobre el canal  $hNa_v$  1.9, un canal que está implicado en la transmisión de señales nociceptivas pero que poco se ha estudiado comparado con otras isoformas de los canales de sodio. Esto debido principalmente a la complejidad que representa su aislamiento en sistemas homólogos (células DRG) y la dificultad que se ha encontrado para su expresión en sistemas heterólogos. Nosotros logramos la expresión del canal  $hNa_v$  1.9 coexpresado junto con la subunidad  $\beta$ 1 en células CHO-K1. Para los registros electrofisiológicos se utilizó la técnica de fijación de voltaje de célula completa. Se observó que la ACEA produce un bloqueo dependiente de concentración, con una  $EC_{50}$  de 12  $\mu$ M. y número de Hill de 0.88, y no desplaza el pico de corriente, así como tampoco modifica el umbral de activación ni el potencial de inversión. La ACEA desplaza significativamente el  $V_{1/2}$  de la inactivación de estado estable hacia potenciales hiperpolarizantes, pero no produce cambios significativos en el  $V_{1/2}$  de activación, ni en la pendiente. Este desplazamiento de la curva de inactivación hacia potenciales más negativos, disminuye las corrientes de ventana, por lo que es posible que por este mecanismo, el fármaco pueda modular la excitabilidad celular. La ACEA también muestra un bloqueo dependiente de uso, similar al observado en los anestésicos locales, por lo que el fármaco mostraría

afinidad por el estado inactivado. El tiempo de instalación del fármaco y su alta liposolubilidad apuntan a que el fármaco actúa atravesando la membrana plasmática, aunque es necesario realizar estudios más profundos al respecto.

## INTRODUCCIÓN.

La *Cannabis sativa*, y más concretamente los productos extraídos de esta planta, marihuana y hachís, son desde mediados del siglo XX, una de las drogas de abuso con fines recreativos más consumidas en las sociedades occidentales, debido a su capacidad para alterar la percepción sensorial y causar placer y euforia. Pero esta planta de origen asiático y, probablemente una de las más antiguas cultivadas por el hombre por su gran versatilidad como producto alimenticio, combustible y fibra textil, tiene tras de sí una historia milenaria como planta de uso medicinal. Las primeras evidencias de su utilidad terapéutica se remontan al año 2600 a.C., periodo de reinado del emperador Huang Ti, quien es considerado como el autor de un libro de medicina titulado “Nei Ching”, algunas de cuyas recetas se han conservado hasta la actualidad en el que aparece la primera referencia documentada sobre las aplicaciones médicas del cannabis (Li, 2016). En el antiguo Egipto, numerosos papiros también describen la administración de preparados de cannabis en el tratamiento de diversas dolencias. Pero en Europa, no es sino hasta el siglo XIX cuando el cannabis se convierte en una medicina común y de uso legal por su utilidad en el tratamiento de dolor, convulsiones, espasmos y emesis. Su uso se popularizó en Gran Bretaña en relación con sus propiedades curativas. El divulgador de su aplicación terapéutica fue O`Shaughnessy, que había residido en la India como médico del ejército colonial inglés. Allí, había observado la utilización que se hacía de esta droga para el tratamiento de la rabia, el reumatismo, la epilepsia y el tétanos. Sin embargo, para 1932, su utilización había sido desterrada de la práctica médica en Gran Bretaña. Diez años más tarde lo hizo Estados Unidos. La controversia sobre sus acciones alucinógenas sobre el cerebro había eclipsado sus posibles usos médicos (Evans, 1997). Desde 1971, el uso del cannabis fue controlado por la denominada “Acta de Drogas de Abuso”, que prohibía la utilización médica tanto de la hierba como de sus constituyentes activos, los cannabinoides.

La *Cannabis sativa* contiene más de 460 compuestos químicos diferentes, de los cuales, más de 60 están agrupados bajo el término “cannabinoides”, que hace referencia a las sustancias que tienen una estructura carbocíclica de 21 carbonos.

En 1964, Gaoni y Mechoulam aíslan y determinan la estructura del principal responsable de las propiedades psicoactivas de la planta, el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC), y en 1988, Devane y colaboradores descubren el receptor específico de este cannabinoide, el receptor CB<sub>1</sub>. Más tarde, en 1993 se reporta el hallazgo del segundo receptor de cannabinoides, nombrado CB<sub>2</sub>. Un tercer descubrimiento muy importante es la identificación de ligandos endógenos para los receptores de cannabinoides. El primer endocannabinoide, el N-araquidoniletanolamina, fue encontrado en 1992 y nombrado “anandamida”, que en sánscrito significa “felicidad” (William A. Devane et al., 1992). En 1995, se identificó otro endocannabinoide, el 2-araquidonilglicerol (2-AG) (Sugiura et al., 1995). Estos hallazgos han permitido descubrir y caracterizar en los últimos 25 años un sistema de señalización endógena conocido como “sistema endocannabinoide”. Este sistema ejerce su papel modulador principalmente en el sistema nervioso central (SNC) pero también en el sistema nervioso periférico (SNP) y órganos periféricos, y consta de receptores, ligandos (endógenos, fitocannabinoides o sintéticos) y enzimas responsables de su síntesis y degradación.

Diversos efectos fisiológicos son mediados por la activación o inhibición de los receptores cannabinoides, entre los que destacan: antinocicepción, memoria, actividad locomotora, funciones endocrinas, control de temperatura, náusea y vómito, inflamación, reconocimiento inmune, efectos antitumorales, entre otros. Sin embargo, a pesar de las múltiples investigaciones que se han hecho en relación al uso medicinal de la marihuana, aún quedan muchas dudas por resolver en relación a los mecanismos de acción implicados en los efectos fisiológicos que ejerce. Por ejemplo, diversos ensayos clínicos que involucran a más de mil pacientes con dolor crónico, especialmente neuropático, y con duración desde algunos días hasta varios meses, se han llevado a cabo empleando cannabinoides y se ha reportado reducción significativa del dolor, pero el mecanismo de acción aún no se ha esclarecido (Fine & Rosenfeld, 2013). Si bien, muchos de los efectos de los cannabinoides se ejercen a través de sus receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, se ha demostrado que estos ligandos también se unen y tienen efectos sobre otras estructuras proteicas como canales de calcio,

de potasio, TRPV y de sodio. Estos últimos, también están implicados en la transmisión de señales nociceptivas.

Neuronas sensoriales primarias con axones periféricos que terminan en la piel o las vísceras y los axones centrales que terminan en la médula espinal son responsables de detectar estímulos nocivos percibidos como dolor. Canales iónicos y receptores especializados en las terminales periféricas están involucrados en la generación de un potencial que puede transformarse en un potencial de acción, llevando a la liberación de neurotransmisores en proyecciones centrales, activación de neuronas sensoriales de segundo orden, y el transporte de señales de dolor al cerebro. Se ha encontrado, por ejemplo, que ciertas mutaciones de pérdida de función en los Nav subtipo 1.7 y 1.9 conllevan a una enfermedad genética denominada insensibilidad congénita al dolor (CIP del inglés *congenital insensitivity to pain*) (De Lera Ruiz & Kraus, 2015).

Los canales iónicos son proteínas de membrana que forman canales continuos desde un lado de la membrana hasta el otro a través de los cuales los iones pueden pasar dentro o fuera de la célula. Todos los canales iónicos tienen dos propiedades clave: permeabilidad iónica, que proporciona una vía para que los iones permeen a través de la membrana; y selectividad iónica, que permiten el paso de iones prácticamente de un solo tipo.

La mayoría de los canales iónicos tienen una tercera propiedad conocida como *gating*. El *gating* se refiere a la apertura y el cierre del poro del canal iónico, el cual puede ser controlado por varios estímulos diferentes que incluyen: cambios en el voltaje de la membrana, cambios en las concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{H}^+$ , unión de las proteínas G al canal, entre otros. Un canal determinado sólo estará controlado por un subconjunto de estos diferentes estímulos. En las células excitables eléctricamente, el modo de control más común es el dependiente de voltaje en el que la compuerta se abre o se cierra en respuesta a los cambios en el voltaje de la membrana.

Aunque existen canales iónicos dependientes de voltaje para el sodio, potasio, calcio y cloro, es de interés para nuestro trabajo los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav's), de los cuales se conocen a la fecha diez isoformas (desde Nav 1.1 hasta Nav 1.9 y el Nav<sub>x</sub>). Dependiendo de la distribución preferencial de cada una de estas isoformas en los tejidos, será su principal efecto fisiológico sobre el organismo. Así, por ejemplo, las isoformas Nav 1.7, Nav 1.8 y Nav 1.9 que se encuentran principalmente en el sistema nervioso periférico (SNP), tienen un rol importante en los desórdenes relacionados con el dolor (De Lera Ruiz & Kraus, 2015).

El estudio de los cannabinoides y su relación con los canales de sodio controlados por voltaje, puede darnos nuevos elementos para el entendimiento del mecanismo de acción y posiblemente el desarrollo nuevas herramientas terapéuticas para el tratamiento del dolor y otras patologías para las cuales los cannabinoides muestran gran potencial.

## ANTECEDENTES GENERALES.

### **Canales de sodio controlados por voltaje: Estructura, función y clasificación.**

Los canales de sodio controlados por voltaje ( $\text{Nav}$ ) son proteínas transmembrana que se expresan generalmente en células excitables como neuronas, células secretoras y miocitos. La función más conocida de los canales  $\text{Nav}$  es su participación en la generación y propagación de impulsos eléctricos conocidos como potenciales de acción mediante los cuales se trasmite la información entre células (Catterall et al., 2005). Los canales  $\text{Nav}$  son complejos multiproteicos constituidos por una subunidad principal  $\alpha$  (~260 KDa y aproximadamente 2000 residuos de aminoácidos) que forma el poro por donde transitan los iones sodio en respuesta a despolarizaciones del potencial de membrana y una o dos subunidades auxiliares  $\beta$  (~40 KDa y aproximadamente 220 aminoácidos), cuya función clásica consiste en modular el tráfico de iones y las propiedades biofísicas de la subunidad principal (Catterall, 2000).

La subunidad  $\alpha$  es una proteína formada por cuatro dominios homólogos y cada dominio consiste de seis segmentos transmembrana (S1 a S6) unidos por asas intracelulares y extracelulares (Meisler & Kearney, 2005) (Figura 1). Hasta el momento, funcionalmente se han caracterizado, de manera muy completa, nueve subunidades  $\alpha$  ( $\text{Nav}1.1$ - $\text{Nav}1.9$ ), cada una codificada por un gen distinto (del  $\text{SCN1A}$  al  $\text{SCN5A}$  y del  $\text{SCN8A}$  al  $\text{SCN11A}$ ), y clasificadas por su homología y sensibilidad a la tetrodotoxina (TTX). Las subunidades  $\text{Nav}1.1$  a  $\text{Nav}1.4$ , junto con  $\text{Nav}1.6$  y  $\text{Nav}1.7$  son consideradas sensibles a la TTX, ya que la  $\text{IC}_{50}$  de la toxina requerida para bloquear su actividad se encuentra en el rango nanomolar; mientras que las subunidades  $\text{Nav}1.5$ ,  $\text{Nav}1.8$  y  $\text{Nav}1.9$  son resistentes a la TTX, ya que se requieren concentraciones micromolares para bloquearlas (Catterall et al., 2005) (Tabla 1). Esta resistencia se debe a la presencia de los aminoácidos serina ( $\text{Nav}1.8$  y  $\text{Nav}1.9$ ) y cisteína ( $\text{Nav}1.5$ ) dentro del asa (*linker*) que une los segmentos S5 y S6, mientras

que los canales  $\text{Na}_v$  sensibles a TTX albergan residuos de aminoácidos con anillos aromáticos en dichas asas (Leffler et al., 2005).

A la fecha se conocen cuatro genes que codifican para subunidades auxiliares  $\beta$  de canales de sodio:  $\text{Na}_v\beta 1$  a  $\text{Na}_v\beta 4$  (Goldin, 2001). Las subunidades  $\beta$  tienen un solo segmento transmembrana y un extremo amino extracelular prominente con el cual, además de modular la actividad de la subunidad  $\alpha$ , pueden interactuar con otras proteínas y establecer complejos de adhesión con células adyacentes y con la matriz extracelular (Lori L. Isom, 2002). Cuando la estructura primaria y la expresión funcional de la subunidad  $\beta 1$  fue publicada por Isom y colaboradores, reportaron que la coexpresión de subunidades  $\beta 1$  con subunidades  $\alpha$ , incrementa el tamaño del pico de corriente de sodio, acelera su inactivación y modifican la dependencia de voltaje de inactivación hacia potenciales de membrana más negativos (L. L. Isom et al., 1992).

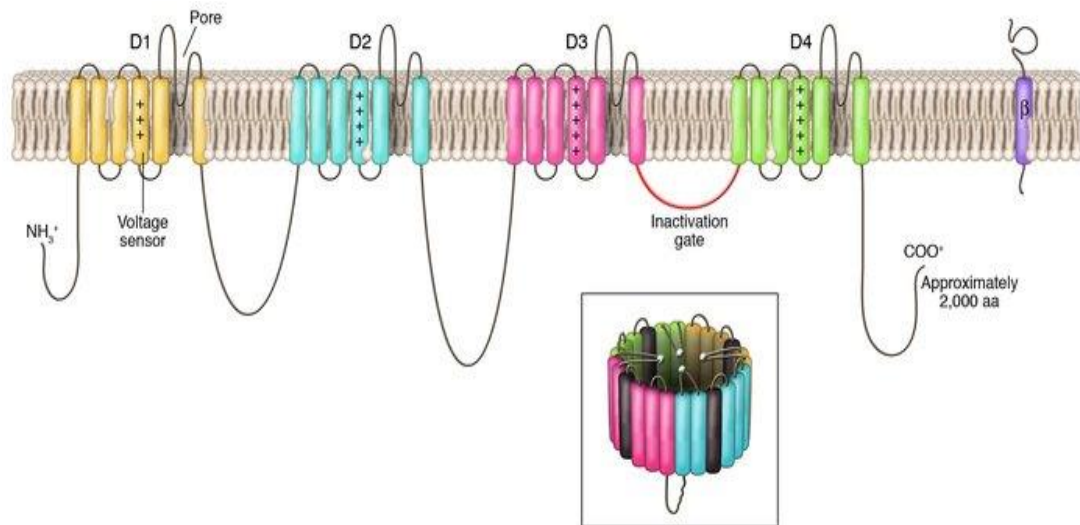


Figura 1. Subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del canal de sodio activado por voltaje. Se muestran los cuatro dominios homólogos de la subunidad  $\alpha$ , los cuales se representan por un color diferente. (Modificada de Meisler & Kearney, 2005).

Isoforma Na <sub>v</sub>	Genes	Sensibilidad a TTX
Na <sub>v</sub> 1.1	SCN1A	Sensible
Na <sub>v</sub> 1.2	SCN2A	Sensible
Na <sub>v</sub> 1.3	SCN3A	Sensible
Na <sub>v</sub> 1.4	SCN4A	Sensible
Na <sub>v</sub> 1.5	SCN5A	Resistente
Na <sub>v</sub> 1.6	SCN8A	Sensible
Na <sub>v</sub> 1.7	SCN9A	Sensible
Na <sub>v</sub> 1.8	SCN10A	Resistente
Na <sub>v</sub> 1.9	SCN11A	Resistente

Tabla 1. Clasificación farmacológica de los Na<sub>v</sub>'s. Modificado de Lera Ruiz, M. and Richard L. Kraus (2015).

El filtro de selectividad (SF del inglés *selectivity filter*) se encuentra dentro del dominio del poro (PD). Es la parte más angosta del poro y tiene la capacidad de distinguir iones con la misma carga y radio. El SF está compuesto invariablemente por 4 aminoácidos: aspartato (D) en el dominio DI; glutamato (E) en el dominio DII; lisina (K) en el dominio DIII; y alanina en el dominio DIV (DEKA). Estos aminoácidos constituyen la parte geoméricamente más angosta y se le conoce como sitio de constricción o anillo interno y permite, selectivamente, el paso de iones de Na<sup>+</sup> hidratados. Algunos investigadores han demostrado que el reemplazo de la lisina en la posición 1237 por glutamato, conduce a la abolición de la selectividad al Na<sup>+</sup>, haciendo al canal permeable al K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y Ba<sup>2+</sup>, además del Na<sup>+</sup>. Cerca de la región extracelular, hay otro anillo formado por dos residuos de glutamato y dos residuos de aspartato (EEDD) y se le conoce como anillo externo, el cual también juega un rol importante en la permeabilidad del Na<sup>+</sup> (Heinemann, S. H., Terlau, H., Stuhmer, W., Imoto, K., & Numa, 1992).

La compuerta de inactivación es otro elemento estructural en la subunidad  $\alpha$  la cual consiste de un asa intracelular que conecta los segmentos S6 del dominio DIII y S1 del dominio DIV, la cual posee una secuencia de tres aminoácidos: isoleucina, fenilalanina, y metionina (IFM). Esta compuerta de inactivación actúa como una “bisagra colgante” que se dobla desde el lado intracelular del poro y lo bloquea durante la inactivación rápida (Catterall, 2000).

El sensor de voltaje está formado por 4 segmentos transmembrana (S1 a S4). El segmento S4 contiene al menos 3 residuos de aminoácidos cargados positivamente (argininas y lisinas), mientras que los segmentos S1, S2 y S3 contienen aminoácidos cargados negativamente altamente conservados (aspartato y glutamato), así como aminoácidos aromáticos (triptófano, fenilalanina y tirosina). Bajo el efecto del voltaje, el segmento S4 se mueve hacia el medio extracelular y causa un cambio conformacional que resulta en la apertura del poro (Yang & Horn, 1995).

La activación de los canales sodio depende del potencial de membrana detectado por el sensor de voltaje, el cual determinará el estado en el que el canal reside. A potenciales de reposo hiperpolarizantes, la probabilidad de que los canales de sodio se encuentren abiertos es baja. La despolarización de la membrana facilita un cambio conformacional de la subunidad  $\alpha$  inducido por el movimiento dentro del dominio del sensor de voltaje, resultando en la apertura del poro del canal. Los canales  $\text{Na}_v$  se abren de manera rápida provocando la entrada de  $\text{Na}^+$  que provoca la fase ascendente del potencial de acción en nervios y fibras musculares. Al cabo de unos milisegundos, ocurre una transición de los canales abiertos a un estado inactivado no conductor. La inactivación rápida de los canales  $\text{Na}_v$  se refiere al rápido decaimiento de las corrientes de sodio ( $I_{\text{Na}}$ ) observado en respuesta a despolarizaciones cortas por medio del cierre de la compuerta de inactivación intracelular. En contraste, la inactivación lenta de los canales se desarrolla cuando las fibras musculares o nerviosas son despolarizadas por periodos largos, y es causada por cambios a largo plazo en el potencial de reposo de la membrana o durante periodos largos de disparos repetitivos neuronales intracelular (Catterall, 2014). En general, los  $\text{Na}_v$ 's son canales transitorios rápidos que se inactivan en un

lapso de milisegundos, sin embargo, bajo ciertas circunstancias, una inactivación rápida incompleta puede generar corrientes persistente de sodio. Mutaciones en los genes SCN1A, SCN2A, SCN3A y SCN8A, causan defectos en la compuerta de inactivación, incrementando las corrientes persistentes de sodio ( $I_{Na}$ ) provocando ataxia y epilepsia (Eijkelkamp et al., 2012).

Además de las propiedades intrínsecas, los efectos que en un organismo producen los canales iónicos, están relacionados con su distribución dentro del mismo. Por ejemplo, el canal  $Na_v1.5$  se encuentra altamente concentrado en el corazón, lo que conlleva a que una alteración en este canal, tendrá como consecuencia una alteración en la función cardiaca. En la tabla 2 se muestran la distribución de las diferentes isoformas de los  $Na_v$  en los tejidos y sus patologías asociadas.

Tejido	Isoforma $Na_v$	Efecto del $Na_v$
Sistema Nervioso Central	1.1, 1.2, 1.3, 1.6	Epilepsia, migraña, autismo, ataxia
Retina	1.8, 1.9	Proceso visual alterado
Neuronas sensoriales olfatorias	1.7	Anosmia
Neuronas sensoriales vagales que inervan las vías respiratorias	1.7, 1.8, 1.9	Tos
Músculo cardiaco	1.5, 1.8	Síndrome de Brugada, Síndrome del QT, fibrilación auricular
Nervios y músculos relacionados con la respiración	$Na_v$ 's sensibles a TTX	Cese de la respiración (intoxicación por TTX)
Células $\beta$ pancreáticas	1.7	Diabetes
Músculo esquelético	1.4	Parálisis periódica hiperkalémica, Paramiotonía congénita, Parálisis periódica hipokalémica
Piel	1.7, 1.8	Desórdenes del dolor, Comezón paroxística
Neuronas de los ganglios de las raíces dorsales	1.6, 1.7, 1.8, 1.9	Desórdenes del dolor, Comezón paroxística
Células del cáncer	1.1 – 1.9 y subunidades $\beta$	Ovárico, cervical, prostático, mamario, colónico, pulmonar, melanoma, linfoma.

Tabla 2. Distribución de los subtipos de canales de sodio y su efecto. Modificado de Lera Ruiz, M. and Richard L. Kraus (2015).

## Características biofísicas del canal $Na_v1.9$

La isoforma  $Na_v1.9$  se expresa principalmente en las neuronas de pequeño diámetro del sistema nervioso periférico y está implicado en la nocicepción. Este canal posee

características biofísicas particulares, produciendo una corriente de sodio persistente con una cinética lenta de activación e inactivación y una activación a voltajes hiperpolarizantes, activándose cerca del potencial de membrana en reposo (PMR) con un umbral de activación alrededor de los -70mV (Dib-Hajj et al., 2002). La lenta inactivación da como resultado la característica corriente de sodio persistente después de la activación y la lenta cinética de activación probablemente descarta al canal de contribuir a la fase ascendente del potencial de acción (Östman et al., 2008). En realidad, la activación a potenciales de membrana subumbrales del Nav1.9 y el significativo traslape entre la activación y la inactivación dependientes de voltaje, generan una importante corriente de ventana alrededor del potencial de membrana de reposo, lo que significa que el Nav1.9 contribuye al valor de la conductancia de la membrana en reposo (Herzog et al., 2001). Es por esta característica que el canal Nav1.9 sea probablemente capaz de regular la excitabilidad neuronal en reposo y, mediante la prolongación de los efectos despolarizantes de estímulos subumbrales, actúe como un canal de umbral que module la excitabilidad neuronal (Herzog et al., 2001).

## **Sistema endocannabinoide**

### ***Receptores cannabinoides***

La naturaleza liposoluble de los ligandos naturales hizo pensar, en un principio, que estos compuestos ejercían sus efectos a través de interacciones inespecíficas con lípidos de membrana. Pero la inhibición de la actividad adenil ciclasa por el ligando  $\Delta^9$ -THC a través de proteínas Gi/o (Howlett & Fleming, 1984) y la existencia de sitios de unión específicos y de alta afinidad en membranas de cerebro de rata para el ligando cannabinoide sintético CP-55940 (W. A. Devane et al., 1988), demostraron la existencia de receptores cannabinoides. Hasta el momento, los dos receptores clonados, CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas Gi/o con siete dominios transmembrana y comparten un 44% de homología de secuencia. El receptor CB<sub>1</sub> se localiza fundamentalmente en el sistema nervioso central; el receptor CB<sub>2</sub>, en el bazo, amígdalas y células del sistema inmunológico

(Fraguas-Sánchez et al., 2014). La estructura de ambos receptores se muestra en la Figura 2.

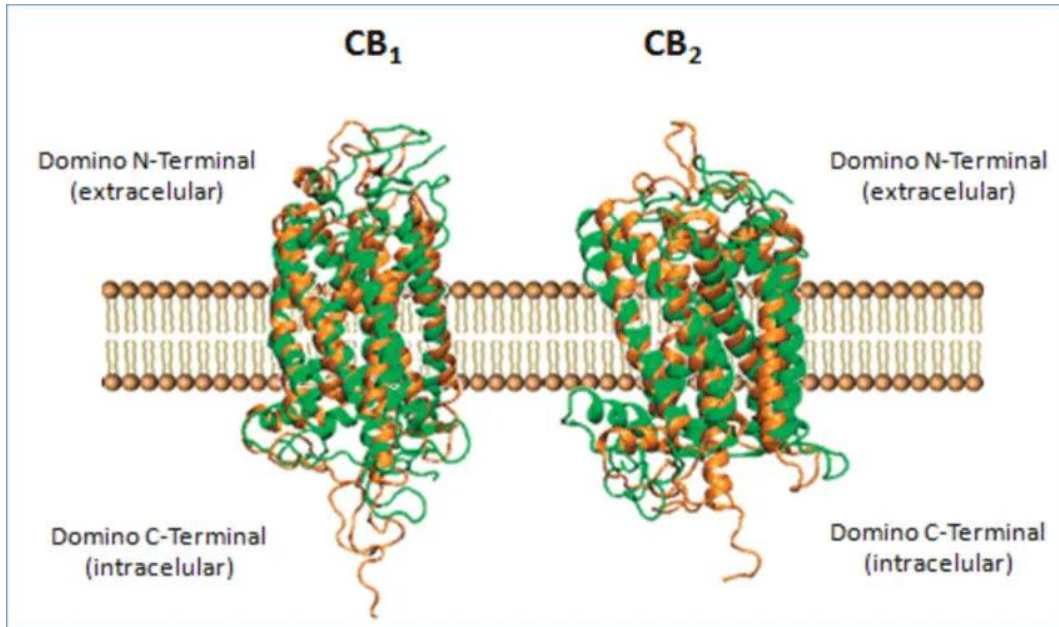


Figura 2. Estructura de los receptores cannabinoides. Modificado de Fraguas-Sánchez et al., 2014.

El receptor CB<sub>1</sub>, clonado por primera vez a partir de cerebro de rata por Matsuda en 1990 y poco después (1991) a partir de muestras de tronco cerebral de humano por Gerard y colaboradores, es el más abundante en cerebro de mamífero. Se localiza principalmente en neuronas del cerebro, médula espinal y sistema nervioso periférico, pero también en órganos y tejidos periféricos como son células inmunes, glándulas adrenales, hipófisis, corazón, pulmón y partes del tracto gastrointestinal, urinario y reproductivo (Howlett et al., 2002). Recientemente se han unido a la lista, adipocitos (Cota et al., 2003), hígado (Osei-Hyiaman et al., 2005) y células parietales de estómago (Pazos et al., 2008).

Estudios de autorradiografía (Herkenham et al., 1991) e inmunohistoquímica (Tsou et al., 1998) en rata muestran con detalle su distribución en el Sistema Nervioso Central (SNC), encontrando una mayor densidad de receptores en ganglios basales,

hipocampo y cerebelo. Estas áreas del cerebro están relacionadas con la actividad motora, capacidad cognitiva y memoria, y coordinación respectivamente, de modo que algunos de los efectos farmacológicos ejercidos por cannabinoides están vinculados a la distribución del receptor CB<sub>1</sub>. En humanos, esta distribución se mantiene aunque se encuentra una expresión mayor del receptor en la corteza límbica que en regiones motoras y sensoriales, lo que sugiere que CB<sub>1</sub> desempeña un papel importante en el procesamiento de la información motivacional y cognitiva (Glass et al., 1997).

Su expresión es mayoritariamente presináptica, en axones y terminales nerviosos, donde puede mediar la inhibición de la liberación de neurotransmisores, aunque también puede estar presente en las dendritas y soma de neuronas (Howlett et al., 2002).

El receptor CB<sub>2</sub> se clonó en el año 1993 por Munro y colaboradores a partir de células mieloides de bazo. A diferencia del receptor CB<sub>1</sub>, el receptor CB<sub>2</sub> se encuentra fundamentalmente en células del sistema inmunológico (linfocitos B, T, monocitos, etc.) y, en menor grado, en nódulos linfáticos y en el bazo (Howlett et al., 2002). Tras años de gran controversia, ahora se acepta que la distribución de CB<sub>2</sub> no es estrictamente periférica y que también se encuentra en el SNC. Ross y colaboradores en el 2001 detectaron expresión de CB<sub>2</sub> in vitro en neuronas sensoriales y, Van Sickle en el 2005 localizaron el receptor en neuronas del tallo cerebral donde podría modular la emesis.

En los últimos años, varios estudios sugieren la existencia de receptores cannabinoides adicionales, distintos de CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, capaces de mediar efectos específicos en la transmisión sináptica, el sistema vascular y el sistema inmune. Cabe destacar el receptor GPR55 (receptor huérfano acoplado a proteínas G). Este receptor fue caracterizado, por Ryberg y colaboradores en el 2007, quienes han demostrado que varios cannabinoides, incluyendo endógenos como anandamida (AEA) y el 2-AG, naturales como el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) y sintéticos como el CP-55940 y el O-1602, se comportan como agonistas potentes de GPR55,

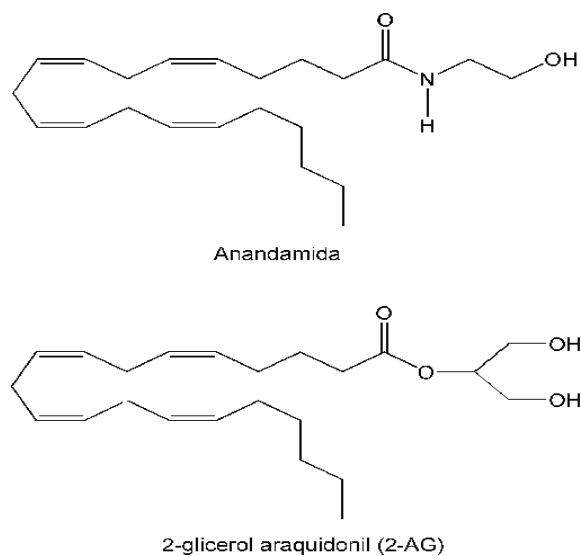
por lo que se propone como candidato a convertirse en el receptor cannabinoide que controle el tono vascular (Ryberg et al., 2007).

Otro receptor estudiado es el receptor vaniloide TRPV<sub>1</sub>, un receptor ionotrópico, activado por capsaicina, el ingrediente activo del chile picante (Caterina et al., 1997), que se expresa en neuronas sensoriales primarias, SNC y células no neuronales (Sánchez et al., 2005). Los receptores TRPV<sub>1</sub> y CB<sub>1</sub> comparten los ligandos AEA y N-araquidonil-dopamina (NADA) (Zygmunt et al., 1999), además, el AEA es capaz de modular la activación de TRPV<sub>1</sub>, teniendo una implicación potencial en el tratamiento de desórdenes inflamatorios, respiratorios y cardiovasculares (Ross, 2003). La relación existente entre el sistema vaniloide y cannabinoide es evidente, y por ello, TRPV<sub>1</sub> puede ser considerado un receptor cannabinoide ionotrópico (Jordt et al., 2004).

### ***Ligandos cannabinoides.***

Los ligandos cannabinoides se pueden clasificar en tres grandes grupos: *endocannabinoides*, *fitocannabinoides* y *cannabinoides sintéticos*.

El primer grupo lo conforman los *endocannabinoides*, que son compuestos derivados de ácidos grasos poliinsaturados, siendo los más conocidos y estudiados hasta el momento la N-araquidoniletanolamida o anandamida (AEA) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG) (Figura 3). En los últimos años se han identificado en el SNC otros cannabinoides endógenos, como son el noladin éter (2-araquidonilglicerol éter), la virodamina (O-araquidoniletanolamina), la N-araquidonil-dopamina (NADA) y la docosatetraeniletanolamida (Childers et al., 1993). La anandamida tiene una estructura que no está relacionada con los cannabinoides naturales derivados de la planta *Cannabis sativa*, pero produce los efectos clásicos de la actividad cannabinoide como son la inmovilidad, la catalepsia, la analgesia y la hipotermia (William A. Devane et al., 1992).



*Figura 3. Estructura química de los principales endocannabinoides.  
Fuente: pubchem.ncbi.nlm.nih.gov.*

La síntesis de la anandamida se produce en dos pasos sucesivos. En primer lugar, la enzima N-acetiltransferasa (NAT) cataliza la formación del precursor N-araquidonil-fosfatidil-etanolamina (NAPE), y en una segunda fase este precursor es hidrolizado por la fosfolipasa D (PLD) (Di Marzo et al., 1994). La liberación de anandamida es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y se produce tras la despolarización neuronal (Cadas et al., 1996). La inactivación de este endocannabinoide también requiere dos etapas. Se postula que la primera es la recaptación de la anandamida extracelular por un transportador de alta afinidad que aún no ha sido clonado, y la segunda es la hidrólisis intracelular catalizada por la enzima amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH), dando lugar a sus dos componentes fundamentales: el ácido araquidónico y la etanolamina (Cravatt et al., 1996) (Figura 4).

Por su parte, el 2-araquidonilglicerol (2-AG) se sintetiza por la acción de la enzima diacilglicerol lipasa, que convierte el diacilglicerol en 2-araquidonilglicerol. En cerebro su liberación también está mediada por el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular provocado por la despolarización neuronal. Tras su liberación, el 2-araquidonilglicerol es

recaptado rápidamente, y consecutivamente degradado por acción de la monoacilglicerol lipasa, que lo convierte en ácido araquidónico (Stella et al., 1997).

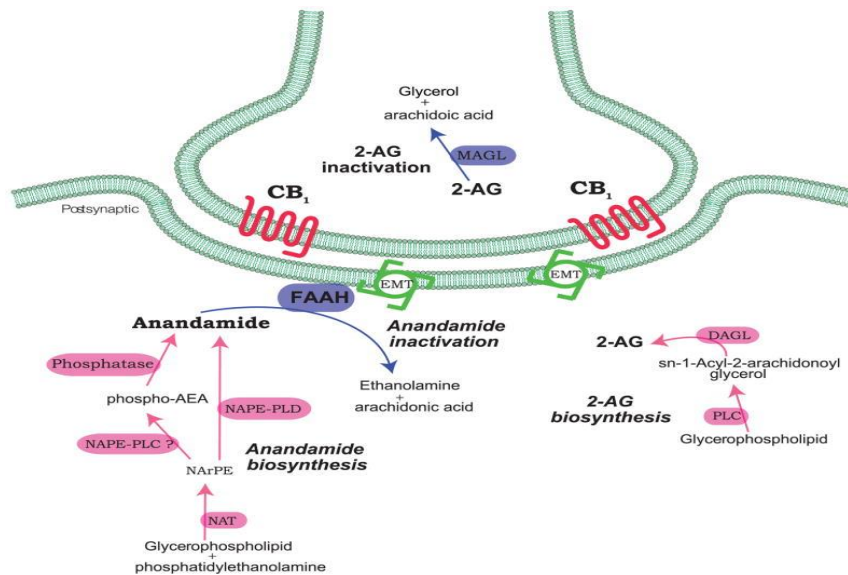


Figura 4. Esquema de la síntesis y degradación de AEA y 2-AG en neuronas pre y postsinápticas (Modificado de Pacher y cols. 2006). EMT: transportador de endocannabinoides; DAGL: diacilglicérido lipasa; FAAH: amido hidrolasa de ácidos grasos; MAGL: monoacilglicerol.

El segundo grupo es el de los *fitocannabinoides*. Con este término se designa a los más de 60 cannabinoides presentes en la planta *Cannabis sativa*. Los más importantes se describen a continuación y su estructura química se puede observar en la figura 5.

El  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) es el responsable de las propiedades psicoactivas del cannabis. Se comporta como agonista parcial de CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> (Roger G. Pertwee, 2008).

El  $\Delta^8$ -tetrahidrocannabinol ( $\Delta^8$ -THC) sólo aparece en algunas variedades de la planta y su concentración es muy pequeña en comparación con la de  $\Delta^9$ -THC. Su perfil farmacológico es muy parecido a  $\Delta^9$ -THC, aunque sus efectos son más débiles (Mechoulam & Hanuš, 2000).

El Cannabinol (CBN) fue el primer cannabinoide obtenido en una forma pura y presenta mayor afinidad por el receptor CB<sub>2</sub> que por el receptor CB<sub>1</sub>. También tiene propiedades psicoactivas, pero son aproximadamente una décima parte de las descritas para Δ<sup>9</sup>-THC (Munro et al., 1993).

El Cannabidiol (CBD) es el principal constituyente no psicoactivo del cannabis y un potente antioxidante. Tiene muy poca afinidad por los receptores cannabinoides, aunque, muy recientemente, se ha señalado que puede actuar como antagonista de los agonistas de CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> (Roger G. Pertwee, 2008). CBD tiene efectos biológicos de potencial interés terapéutico en neuroprotección, náuseas, emesis, isquemia cerebral, diabetes tipo 1, ansiedad, artritis reumatoide y cáncer (Mechoulam et al., 2007).

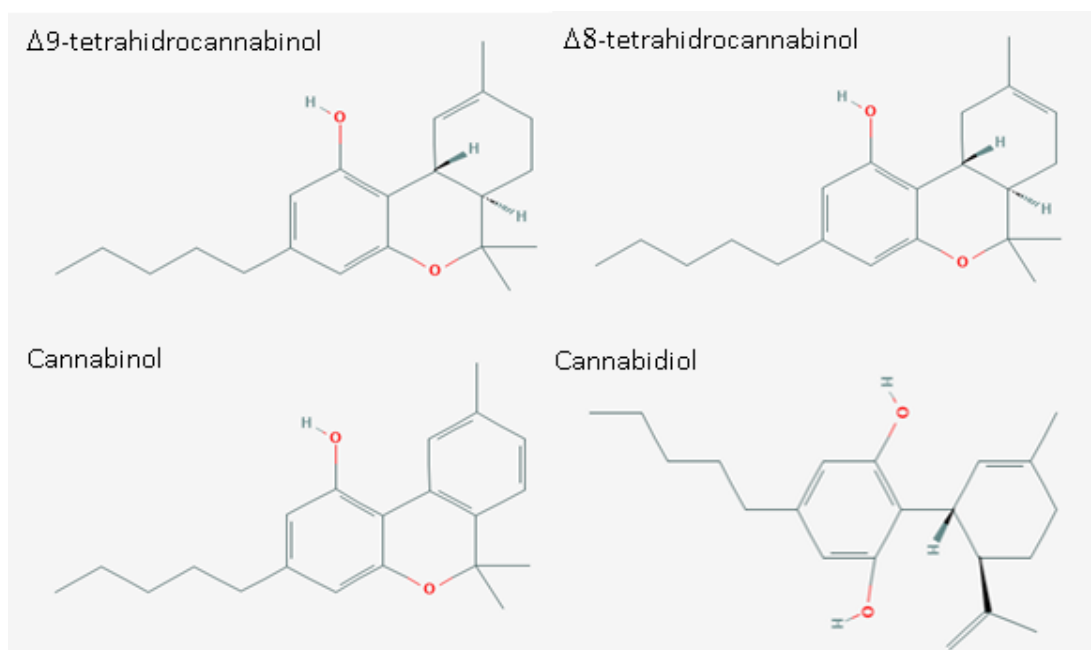


Figura 5. Estructura química de los principales fitocannabinoides.  
Fuente: [pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

Finalmente, los *cannabinoides sintéticos* se clasifican en cuatro categorías: clásicos, no clásicos, aminoalquilindoles y eicosanoides.

Los agonistas clásicos mantienen la estructura de dibenzopirano de los fitocannabinoides y se incluyen compuestos como HU-210, nabilona, dronabinol, y

ácido ajulémico (CT3), todos ellos ligandos de CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> (Palmer et al., 2002). Nabilona (Cesamet®) y dronabinol (Marinol®) se comercializan para controlar las náuseas y vómitos producidos por la quimioterapia (Ben Amar, 2006) y prevenir la pérdida de peso en pacientes con SIDA, respectivamente (Beal et al., 1995). El ácido ajulémico es un potente antiinflamatorio y analgésico sin efectos psicoactivos o sobre el comportamiento. La distribución, mayoritariamente periférica de los receptores CB<sub>2</sub>, les ha convertido en una diana atractiva para el desarrollo de fármacos, ya que además su estimulación está desprovista de los efectos psicotrópicos mediados por CB<sub>1</sub>. Por ello, se han desarrollado agonistas selectivos, como son JWH-051, JWH-133, JWH-139, L759633 y L-759656, capaces de unirse a CB<sub>2</sub> a concentraciones por debajo del rango nanomolar (Howlett et al., 2002).

Los agonistas no clásicos son análogos bicíclicos y tricíclicos de  $\Delta^9$ -THC que carecen del anillo de pirano. El principal representante es el CP-55940, agonista de ambos receptores, el cual fue utilizado por Devane y colaboradores en 1988 para demostrar la existencia de receptores cannabinoides. Dentro de ellos se encuentra también el levonantradol que se emplea administrado intramuscularmente como antiemético y analgésico (Ben Amar, 2006).

El tercer grupo lo conforman los aminoalquilindoles, cuya estructura química de estos compuestos difiere bastante de la de los grupos anteriores, y su principal representante es WIN-55212, agonista de los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> (Palmer et al., 2002). Los agonistas selectivos CB<sub>2</sub> de este grupo, JWH-015, L-768242, AM124, GW405833 y GW842166X tienen efectos útiles en modelos de inflamación y dolor (Howlett et al., 2002).

Finalmente, en el cuarto grupo se encuentran los eicosanoides, derivados principalmente de la estructura de la anandamida (AEA), pero más estables a la hidrólisis enzimática que el endocannabinoide, encontramos metanandamida (AM356), araquidonil-ciclopropilamida (ACPA) y, el fármaco de nuestro interés, la araquidonil-2-cloroetilamida (ACEA), todos ellos agonistas selectivos de CB<sub>1</sub> (Howlett et al., 2002).

En cuanto a los antagonistas, tenemos algunos que son selectivos de CB<sub>1</sub> como SR141716A, AM251 y AM281 (Howlett et al., 2002). El SR141716A, también conocido como rimonabant (Acomplia®), fue el primer antagonista descrito para CB<sub>1</sub> y ha sido probado para el tratamiento de obesidad, dependencia al tabaco y factores de riesgo cardiometabólicos (Gelfand & Cannon, 2006). Hace algunos años se anunció la suspensión temporal de los ensayos clínicos realizados con rimonabant así como su comercialización como fármaco contra la obesidad como consecuencia de los trastornos psiquiátricos derivados de su uso (Lee et al., 2009). Otro antagonista selectivo de CB<sub>1</sub>, perteneciente a otra serie química es LY320135. Los antagonistas selectivos de CB<sub>2</sub> más destacados son SR144528, AM630 y JTE907 (Lambert & Fowler, 2005). Las áreas terapéuticas propuestas para el uso de antagonistas cannabinoides son obesidad, dependencia a nicotina y alcohol, y desórdenes del SNC, entre otras (Grotenhermen, 2005). Todos estos antagonistas, además de prevenir o atenuar acciones cannabimiméticas bloqueando el tono endógeno, también pueden por sí solos provocar efectos contrarios a los evocados por agonistas cannabinoides, comportándose como agonistas inversos en algunos sistemas (R G Pertwee, 1999). Por ello, también se han desarrollado antagonistas neutros, incapaces de producir efectos cannabimiméticos inversos en ausencia de agonistas endógenos o exógenos añadidos.

### ***Transducción de señales***

Los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> pertenecen la clase de receptores acoplados a proteínas G y se acoplan principalmente a proteínas Gi/o, aunque también se ha descrito que también pueden activarse vías de señalización por medio de proteínas Gq (Guzmán, 2003; Ken Mackie, 2008). Sus mecanismos transduccionales mejor descritos comprenden la inhibición de la enzima adenilato ciclasa, la modulación de algunos canales iónicos (aumentan la conductancia del potasio y disminuyen la entrada de calcio) y cambios en la síntesis de algunas proteínas (Figura 6). Ambos receptores regulan también la fosforilación y activación de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), cuya ruta comprende un mecanismo de señalización clave que

regula funciones celulares como crecimiento celular, transformación y apoptosis (Bosier et al., 2010; Ken Mackie, 2008).

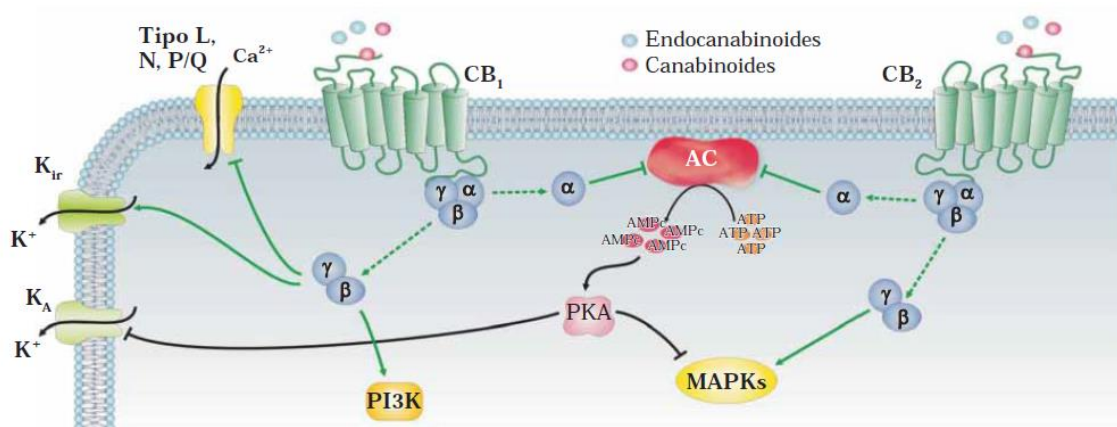


Figura 6. Señalización clásica de los receptores a cannabinoides CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>. La unión del ligando al receptor produce la activación de proteínas G inhibitoras que entonces se disocian en la subunidad  $\alpha$  y el complejo  $\beta\gamma$ . La subunidad  $\alpha$  inhibe a la enzima adenilato ciclasa (AC). Esto se traduce en menor producción de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) y, por lo tanto, en menor actividad de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA), lo cual produce, en última instancia, una disminución de la síntesis de algunas proteínas. Por su parte, el complejo formado por las subunidades  $\beta\gamma$  activa la vía de las cinasas activadas por mitógeno (MAPKs) y de la cinasa de fosfatidilinositol (PI3K). Otros efectos mediados por el receptor CB<sub>1</sub> son una disminución de la actividad de los canales de calcio dependientes de voltaje y un aumento de la conductancia de los canales rectificadores de potasio, lo cual produce hiperpolarización de la célula. (adaptación de Bosier et al., 2010).

La función hasta ahora mejor establecida del sistema endocannabinoide es la de constituir un mecanismo de neuromodulación en el sistema nervioso central de los mamíferos. Así, cuando se activan receptores de neurotransmisores en la membrana plasmática de una neurona postsináptica, ésta sintetiza precursores de endocannabinoides y los escinde para liberar a la hendidura sináptica endocannabinoides funcionalmente activos. Esto acontece, por ejemplo, tras la unión de algunos neurotransmisores como el glutamato a sus receptores ionotrópicos o metabotrópicos. Los endocannabinoides actúan entonces como mensajeros químicos retrógrados, esto es, se unen a receptores CB<sub>1</sub> de la neurona presináptica, lo que conlleva por ejemplo que se dificulte la entrada de iones Ca<sup>2+</sup> (por cierre de canales de Ca<sup>2+</sup> controlados por voltaje) y se facilite la salida de iones K<sup>+</sup> (por la apertura de canales rectificadores de K<sup>+</sup> sensibles a proteínas G). Ello impide la despolarización de la membrana y los procesos de exocitosis, y así se bloquea la liberación de neurotransmisores como el glutamato o el ácido  $\gamma$ -aminobutírico

(GABA). La acción neuromoduladora de los endocannabinoides finaliza mediante su recaptura celular a través de sistemas de transporte de membrana plasmática y su posterior degradación intracelular, que corre a cargo de una variada familia de lipasas entre las cuales la amidohidrolasa de ácidos grasos (fatty acid amide hydrolase, FAAH) y la monoacilglicerol lipasa (MAGL) son las mejor caracterizadas para la anandamida (AEA) y el 2-AG, respectivamente (Pacher et al., 2006).

## ANTECEDENTES PARTICULARES.

Varios grupos de investigadores han mostrado los efectos analgésicos de la anandamida exógena a través de los receptores CB<sub>1</sub> en modelos de dolor neuropático y dolor inflamatorio persistente agudo (Calignano et al., 1998; Fine & Rosenfeld, 2013). Los receptores CB<sub>1</sub> están distribuidos por todas las vías nociceptivas del SNC, incluyendo la sustancia gris periacueductal, amígdala, tracto espinal trigeminal, y el SNP, incluyendo los ganglios de la raíz dorsal (DRG), sugiriendo que los efectos analgésicos de la anandamida son a través de los receptores CB<sub>1</sub>. Sin embargo, la anandamida también actúa sobre otros canales iónicos que participan en las vías de señalización del dolor, incluyendo canales de calcio dependientes de voltaje, canales TASK1, receptores 5-HT<sub>3</sub>, canales de K<sup>+</sup> rectificadores, receptores NMDA (Chemin et al., 2001; K. Mackie et al., 1995; Maingret et al., 2001; Mendiguren & Pineda, 2004; Poling et al., 1996) y canales de sodio dependientes de voltaje, estos últimos juegan un rol esencial en inicialización del potencial de acción y su subsecuente propagación en las células excitables de nervios y músculos. Aún con lo anterior, los mecanismos del efecto analgésico de los cannabinoides permanecen sin ser esclarecidos.

Kim y colaboradores en 2005 examinaron el efecto de la anandamida sobre las corrientes de Na<sup>+</sup> sensibles a tetrodotoxina (TTX-S) y de las corrientes de Na<sup>+</sup> resistentes a tetrodotoxina (TTX-R) en ganglios de la raíz dorsal de las ratas y encontraron que la anandamida inhibía ambas corrientes de manera dependiente de concentración, siendo más grande la inhibición de las corrientes TTX-S que de las corrientes TTX-R (5.4 μM y 38.4 μM respectivamente). Asimismo, la anandamida no produjo una alteración en el voltaje de activación en ninguna de las dos corrientes y parece que afecta más el estado de inactivación de los canales Na<sub>v</sub> que el estado de reposo (Kim et al., 2005).

Por otro lado, Okura y colaboradores en 2014, investigaron los efectos de la anandamida en cuatro isoformas Na<sub>v</sub> (1.2, 1.6, 1.7, y 1.8) expresadas junto con la subunidad β1 utilizando la técnica de fijación de voltaje de célula completa en

ovocitos de *Xenopus laevis*. De igual manera encontraron que la anandamida bloquea las corrientes de Na<sup>+</sup> de manera dependiente de concentración, siendo el Nav 1.6 el canal que presentó mayor efecto inhibitorio, es decir, mientras que el Nav 1.6 requirió una concentración de 12 μmol/L, las isoformas Nav 1.2, Nav 1.7 y Nav 1.8 requirieron concentraciones de 17, 27 y 40 μmol/L respectivamente para tener los mismos efectos. Adicionalmente, encontraron que la anandamida producía un corrimiento despolarizante de la curva de activación, así como un corrimiento hiperpolarizante en la curva de inactivación en todas las isoformas, sugiriendo que la inhibición de las corrientes de sodio era debida a un decremento en la activación y un incremento en la inactivación. Además, la anandamida mostró un bloqueo dependiente de uso en las isoformas 1.2, 1.6 y 1.7, pero no lo mostró en la isoforma 1.8 (Okura et al., 2014).

Además del endocannabinoide anandamida, otro grupo de investigadores ha estudiado los efectos de cannabinoides sintéticos sobre los canales Nav's. Tal es el caso de Nilufar Foadi y colaboradores, quienes en el 2014 mostraron que el ácido ajulémico también inhibía las corrientes de sodio en los canales Nav. Estos estudios se realizaron en canales Nav 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.7 y 1.8, así como en las mutaciones Nav1.5N406K y Nav1.5F1760A y fueron expresados en células HEK-293t (Human Embryonic, Kidney), excepto el Nav1.8 que fue expresado en células ND7/23. Se utilizó la técnica de fijación de voltaje de célula completa y concentraciones de ácido ajulémico de 0.1, 0.3, 1, 3, 10 y 30 μmol/L. La inhibición de las corrientes de sodio fue reversible y dependiente de concentración en todas las isoformas. El bloqueo tónico de los canales en reposo producía valores de concentración inhibitoria media entre 2 y 9 μmol/L y eran fuertemente mejoradas en canales inactivados, sugiriendo una inhibición dependiente de estado del ácido ajulémico. El bloqueo tónico no difirió significativamente entre las isoformas Nav, así como tampoco se observó un bloqueo relevante dependiente de uso, sin embargo, el ácido ajulémico mostró un corrimiento hiperpolarizante en la inactivación dependiente de voltaje. Un dato relevante fue que las mutaciones del Nav1.5 N406K y F1760A, las cuales son insensibles a los anestésicos locales, mostraron una preservada sensibilidad al bloqueo de las corrientes de sodio por el ácido ajulémico, lo que sugiere que este cannabinoide

sintético actúa en un sitio diferente al de los anestésico locales pero aún desconocido (Foadi et al., 2014).

## **JUSTIFICACIÓN.**

Dentro de los efectos terapéuticos que se le han atribuido a los cannabinoides, se encuentra entre otros, la disminución de la percepción del dolor. Asimismo, el canal hNav 1.9, que se expresa principalmente en las neuronas de pequeño diámetro del sistema nervioso periférico, está implicado en la transmisión de las señales nociceptivas. Por lo anterior, resulta de nuestro interés el estudio de los efectos que produce el cannabinoide sintético ACEA, sobre los canales de sodio hNav 1.9 +  $\beta$ 1 coexpresado en células CHO-K1, con el fin de ayudar a esclarecer los mecanismos moleculares que median los efectos analgésicos de los cannabinoides.

## **HIPÓTESIS**

El ACEA reduce las corrientes de sodio del canal hNav 1.9 +  $\beta$ 1 transfectado en células CHO-K1.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivos Generales.**

- Determinar los efectos electrofisiológicos del ACEA sobre las corrientes de sodio en los canales hNav1.9 +  $\beta$ 1

### **Objetivos Específicos.**

- Trasformar bacterias *E. coli* One Shot® TOP10 con los diferentes plásmidos de interés: hNav1.9, subunidad  $\beta$ 1 y proteína verde fluorescente (pEGFP).
- Amplificar y purificar el cDNA del canal hNav1.9, de la subunidad  $\beta$ 1 y de la proteína verde fluorescente (pEGFP).

- Realizar la transfección de las células CHO-K1 con el cDNA del hNav1.9, la subunidad  $\beta 1$  y la pEGFP.
- Determinar la concentración efectiva 50 (EC<sub>50</sub>) del ACEA sobre las corrientes de sodio del canal hNav1.9 +  $\beta 1$ .
- Caracterizar, a través de diferentes protocolos electrofisiológicos, los efectos de la ACEA en la relación corriente-voltaje, la inactivación de estado estable, la conductancia, la recuperación de la inactivación y la dependencia de uso frecuencia de las corrientes de sodio del canal hNav1.9 +  $\beta 1$ .

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Descripción General

Para la realización de este proyecto de investigación se llevó a cabo la siguiente secuencia de pasos:

- Transformación de bacterias One Shot® TOP10 *E. coli* (ThermoFisher Scientific – Cat. 4040–10) con el plásmido de interés.
- Amplificación y purificación del cDNA del canal hNav1.9, subunidad  $\beta 1$  y proteína verde fluorescente (pEGFP)
- Transfección transitoria en células CHO-K1.
- Registro electrofisiológico de las células transfectadas.
- Análisis estadístico de los datos obtenidos.

### Técnicas y procedimientos

#### Transformación de bacterias *E. coli* con el cDNA del canal hNav 1.9

Se colocaron 100  $\mu$ l de bacterias One Shot® (previamente descongeladas) en 2 tubos eppendorf de 1.5 ml estériles (uno para el control y el otro para la muestra). Se adicionaron en el control 100  $\mu$ l de buffer TCM (6.7 mM Tris-HCl pH 7.6, 6.7 mM

CaCl<sub>2</sub> y 6.7 mM MgCl<sub>2</sub>). Posteriormente al tubo de muestra se le adicionaron 2 µl cDNA del canal hNav 1.9 (contenido en el plásmido pcDNA3.1) y 98 µl de buffer TCM. Se mezcló el contenido y se colocó en hielo por 40 minutos. Transcurrido el tiempo, se realizó el choque térmico colocando las muestras en baño maría a 42°C por 2 minutos, cuidando el tiempo y temperatura ya que este paso es crítico para la transformación.

Se colocaron los tubos en hielo por 90 segundos y posteriormente se le adicionaron a cada uno 500 µl de medio LB Broth (SIGMA – Cat. L3022), los cuales se incubaron a 37°C por una hora con agitación constante.

Terminada la incubación, se centrifugaron los tubos a 6,000 rpm por 5 minutos. Se eliminaron aproximadamente 600 µl del sobrenadante y con el resto se resuspendió el botón de bacterias One Shot® transformadas.

Se tomaron 100 µl de la mezcla y se colocaron en placas LB Broth con 100 µg/ml de ampicilina y se distribuyeron por estriado. Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas.

El medio de cultivo para las placas se preparó a razón de 2 gramos de medio LB-Broth (SIGMA– Cat. L3022) por cada 100 ml de agua tridestilada. Una vez disuelto completamente el medio, se ajustó el pH a 7.3 con NaOH 1N. Para la preparación de las placas, se agregó 3 gramos de Agar Select por cada 200 ml del medio. Se colocaron 100 ml de medio Agar-LB-Broth en matraces de 500 ml y se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 15 psi de presión. Posteriormente, se agregó ampicilina a razón de 120 µg/ml y finalmente, la mezcla se vertió en las cajas Petri. La presencia de colonias después de la incubación indica que la transformación tuvo éxito.

### **Amplificación y purificación del cDNA del canal hNav1.9, subunidad β1 y proteína verde fluorescente (pEGFP)**

La amplificación consiste en la replicación de las bacterias que contienen el gen de interés. En este caso puede ser el cDNA del canal hNav1.9, la subunidad β1 o la proteína verde fluorescente (pEGFP). Este procedimiento se realizó en dos pasos: primero se llevó a cabo un precultivo en medio LB-Broth que nos permitía

asegurarnos que las bacterias habían mostrado crecimiento y, en caso positivo, se procedía con el segundo paso, es decir, con el cultivo masivo. En caso negativo, se procedía a cancelar el cultivo masivo, evitando así, el desperdicio de materiales. Como se mencionó anteriormente, las bacterias utilizadas para la propagación del plásmido fueron las *E. coli* One Shot® TOP10.

### **Preparación de medio de cultivo LB**

Para cada instancia de amplificación, se prepararon 350 ml de medio LB a razón de 20 g de medio LB por cada 1000 ml de agua tridestilada (es decir, 7 g para 350 ml de medio). De los cuales, 50 ml se emplearon para el precultivo y los 300 ml restantes se emplearon para el cultivo masivo. El pH del medio de cultivo se ajustó entre 7.30 y 7.35 con una solución de NaOH 1M. El medio de cultivo obtenido se esterilizó a 15 psi de presión por 20 min.

### **Precultivo**

Para la preparación del precultivo, se trabajó en la campana de flujo laminar bajo condiciones estériles y consistió en agregar a 2 tubos Falcon de 15 ml cada uno, 3 ml de medio de cultivo LB previamente esterilizado y el antibiótico requerido de acuerdo al cassette de resistencia que tiene cada plásmido, esto es, para el cDNA del canal hNav1.9 y la subunidad  $\beta 1$  se agregó ampicilina en una concentración de 120  $\mu\text{g}$  por cada ml de medio de cultivo, mientras que para el pEGFP se agregó kanamicina a razón de 50  $\mu\text{g}$  por cada ml de medio de cultivo. Posteriormente, se agregarán 200  $\mu\text{l}$  de bacterias con el cDNA de interés. Se incubarán a 37°C en agitación constante durante 24 horas.

### **Cultivo masivo**

Una vez que el precultivo resultó satisfactorio (el medio de cultivo se torna turbio), se procedió con el cultivo masivo, para lo cual se emplearon tres matraces, cada uno con 100 ml de medio de cultivo LB previamente esterilizado. Posteriormente, se agregó el antibiótico correspondiente siguiendo el mismo criterio del precultivo, seguido de 1 ml del precultivo, el cual contiene las bacterias con el plásmido de

interés. Finalmente, se dejó incubar a 37°C en agitación constante por 24 horas. En este momento, ya se cuenta con la amplificación del plásmido en cantidad suficiente para proceder con la purificación del DNA de interés.

### **Purificación del cDNA**

Para la extracción del ADN plasmídico se utilizó el Kit Hi Speed Plasmid Midi (No. 12643, QIAGEN).

En 6 tubos de 30 ml se distribuyó el contenido de los matraces del cultivo masivo, para posteriormente centrifugarse a 5 000 rpm por 8 minutos a una temperatura de 4°C. Una vez terminada la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 6 ml de buffer de resuspensión distribuidos en los 6 tubos y se resuspendió la pastilla de células de cada tubo y el contenido de los 6 tubos se colocó en uno solo.

Se adicionaron 6 ml de buffer de lisis y se mezclaron hasta obtener una mezcla de color azul la cual se dejó en reposo por 5 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se agregaron 6 ml del buffer de neutralización y se mezcló por inversión hasta que la coloración azul desapareció, esta suspensión se transfirió a una jeringa con filtro y tapón, y se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Durante la incubación se equilibró la columna Hi Speed Midi con 4 ml de buffer de equilibrio QBT. Una vez transcurridos los 10 minutos, se removió la tapa del filtro Cartridge, se insertó el émbolo y se filtró el lisado celular dentro de la columna Hi Speed Midi.

Posteriormente se lavó la columna Hi Speed Midi con 20 ml de buffer QC. Una vez que el contenido pasó por la columna se recuperó el ADN que esta adherido a la resina de la columna con 5 ml de buffer de elusión QF en un tubo de 15 ml.

Se precipitó el ADN adicionando 3.5 ml de isopropanol, se agitó en el equipo vortex y se incubó la mezcla por 5 minutos a temperatura ambiente. Durante la incubación se quitó el émbolo de la jeringa de 20 ml y se colocó el filtro precipitador QIA Midi. Una vez que pasó el tiempo de incubación, se transfirió la mezcla ADN-Isopropanol a la jeringa, y se filtró. Después se removió el filtro precipitador QIA Midi. Se colocó nuevamente el filtro precipitador QIA Midi y se lavó con 2 ml de etanol al 70%.

Nuevamente se removió el filtro precipitador QIA Midi, se sacó el émbolo y se colocó el precipitador QIA Midi para introducir aire y de esta forma secar el filtro.

Se quitó el émbolo de la jeringa de 5 ml y se colocó el precipitador QIA Midi, agregando 500  $\mu$ l de buffer TE, se colocó el émbolo y se recuperó el ADN plasmídico en un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml. Este último paso se repitió dos veces.

Para corroborar que el producto obtenido sea el cDNA de interés, se tomó una muestra y se le aplicará un procedimiento de electroforesis en gel de agarosa al 8% en solución TBE al 0.5X, 1  $\mu$ l de bromuro de etidio como colorante y se comparó con un marcador de peso molecular. La muestra analizada se preparó con 1  $\mu$ l del cDNA de interés, 2  $\mu$ l de buffer de carga y 7  $\mu$ l de agua esterilizada. La fuente de poder se ajusta a 100V, 80mA por 30 minutos. Después de este tiempo, el gel se observó al transiluminador donde se verificó la presencia de la banda generada correspondiente al cDNA.

Por último, se determinó la concentración de cDNA obtenida mediante espectrofotometría utilizando un equipo Nanodrop.

### **Transfección del canal hNav1.9 + $\beta$ 1 en la línea celular CHO-K1**

La transfección en células CHO-K1 se realizó mediante el método químico de la lipofectamina, para lo cual, se empleó 4  $\mu$ g de cDNA de hNav1.9, mientras que para  $\beta$ 1 y pEGFP se emplearon concentraciones de 2 a 1 y 0.25 a 1 con respecto a hNav1.9, respectivamente, es decir, [hNav1.9]:[ $\beta$ 1]:[pEGFP] en proporción 1:2:1/4.

Los reactivos empleados para la transfección fueron: medio de cultivo Advanced DMEM reduced serum medium 1X, (GIBCO 12491, Invitrogen) suplementado con 3% de suero fetal bovino (Invitrogen), 1% de L-glutamina y 1% de una mezcla de antibióticos-antimicóticos (Sigma-Aldrich, 1000 U penicilina / 0.1 mg estreptomycin / 0.25  $\mu$ g anfotericina; medio no suplementado (Advanced DMEM libre de suero y antibióticos y antimicóticos), cDNA hNav1.9, cDNA  $\beta$ 1, cDNA pEGFP; Lipofectamina LTX y Plus Reagent (Invitrogen).

Las células CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary, ATCC, Rockville, MD, USA), se cultivaron en monocapa y se mantuvieron en medio de cultivo Advanced DMEM

suplementado, con una atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> y 95% de O<sub>2</sub>, a una temperatura de 37°C.

Previo a la transfección, las células se sembraron en cubreobjetos (Thermanox® Plastic Coverslips, NUNC Brand Products) y se colocaron en Cajas Petri de 35 mm de diámetro.

A las 48 horas de sembradas se realizó la transfección transitoria en una campana de flujo laminar mediante el método de lipofectamina siguiendo las indicaciones del fabricante que a continuación se describen: se vierten 200 µl de medio de cultivo Advanced DMEM no suplementado en un tubo recolector de 1.5 ml, al que se añaden el cDNA pEGFP, el cDNA hNav1.9 y el cDNA β1 en la proporción arriba indicada (0.25:1:2 respectivamente). Se resuspende la mezcla y se deja a temperatura ambiente por 5 minutos en cada uno de los pasos. Posteriormente, se añaden 7.5 µl de Lipofectamina LTX y se dejan 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añaden 7.5 µl de Plus Reagent dejando la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las cajas de Petri con las células CHO-K1 previamente sembradas se lavan con medio de cultivo Advanced DMEM no suplementado añadiendo después del lavado 775 µl del medio de cultivo Advanced DMEM no suplementado (libre), e inmediatamente se les aplica la mezcla dejándolas incubar a 36.5 °C en una estufa de cultivo por 3 horas. Finalmente se agrega 1 ml de medio de cultivo DMEM suplementado.

Cabe mencionar, que en base a experimentos, a las 48 horas de la transfección se observó que se tenía la mejor expresión del canal para realizar los registros electrofisiológicos. Esto es, se observó que la amplitud de las corrientes registradas era mayor a las 48 horas comparadas con las corrientes obtenidas a las 24 y 72 horas después de la transfección.

## **Registro electrofisiológico**

### **Soluciones para el registro electrofisiológico**

Solución interna (mM): NaCl 35, CsF 105, EGTA 5, Cs-HEPES 10, el pH se ajustó a 7.3 con KOH 1M.

Solución externa (mM): NaCl 140, KCl 4, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES-K<sup>+</sup> 10, Dextrosa 2.5 y el pH se ajustó a 7.3 con NaOH 1M.

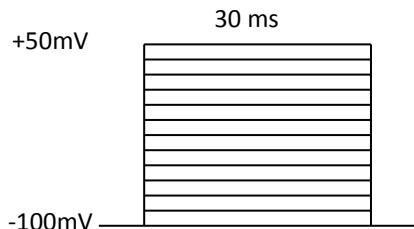
Para el registro electrofisiológico se utilizó un microscopio invertido (Nikon TMS), en cuya cámara de registro se colocó el cubreobjetos con las células CHO-K1 transfectadas. Posteriormente las células se perfundieron con la solución externa. El intercambio de soluciones se realizó utilizando un sistema de perfusión el que consiste de un arreglo de 6 válvulas (pinch valves, NResearch® Inc., W. Caldwell, NJ. USA) operadas a distancia por un circuito controlador programable, compatible con sistemas operativos Windows® (Val-608®, Cides Tecnología, Puebla, Pue. México). Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente de 22°C ±1. Los registros electrofisiológicos se realizaron mediante la técnica de fijación de voltaje en configuración de célula completa, empleando un sistema de amplificación Axopatch 200B (Axon Instruments) seleccionando las células CHO-K1 que expresaran la proteína verde fluorescente (pEGFP) como marcador. Los microelectrodos se fabricaron en un estirador (puller) P-97 Sutter Instrument Co. y vidrio de borosilicato (TW150F-6), buscando una resistencia final de 1.0 a 2.0 MΩ. Para el registro de las corrientes, se colocó el microelectrodo de borosilicato sobre la superficie de la membrana celular con ayuda de un micromanipulador, y se procedió a formar un sello de alta resistencia (GΩ), para después romper el sello por medio de una succión gentil. Las células se compensaron a un 80% aproximadamente y se procedió a aplicar los protocolos experimentales que abajo se indican. Todos los protocolos de estimulación y registro de corrientes se llevaron a cabo mediante el programa Clampex 10.6 (Axon Instruments) y el convertidor analógico-digital de 16 bits Digidata 1440A (Axon Instruments).

### **Protocolos experimentales**

Todos los protocolos experimentales se aplicaron en ausencia y en presencia del fármaco para cada una de las células. Para evaluar la recuperación de las corrientes tras la aplicación del fármaco se realizó el lavado a través de la perfusión con solución control durante 10 minutos. Durante el desarrollo de los protocolos experimentales se mantuvo un flujo permanente y constante a razón de 1ml/min.

## Protocolo de Activación

Para generar las corrientes de sodio del canal  $\text{Na}_v 1.9$  en células CHO-K1, se aplicaron pulsos despolarizantes partiendo de un potencial de sostenimiento desde -100 mV hasta +50 mV en pasos de 10 mV con duración de pulso de 30 ms. Para construir la relación corriente contra voltaje se midió la magnitud del pico de la corriente generada en cada paso de voltaje y se normalizó contra el pico máximo de la corriente obtenida en condiciones control. Estos valores fueron graficados en función del potencial de membrana. Asimismo, se determinó el voltaje al cuál se obtiene la máxima amplitud de corriente para su utilización en protocolos posteriores, el cual fue cercano a los -40 mV.



## Determinación de la concentración efectiva media ( $\text{EC}_{50}$ )

Para determinar la concentración del fármaco a la cual se obtiene el 50% del efecto total (evaluando dicho efecto como una reducción de las corrientes de sodio a través del canal  $\text{Na}_v 1.9 + \beta 1$ ), se aplicaron diferentes concentraciones (0.3 $\mu\text{M}$ , 1 $\mu\text{M}$ , 3 $\mu\text{M}$ , 10 $\mu\text{M}$ , 30 $\mu\text{M}$  y 100 $\mu\text{M}$ ) y los datos obtenidos se ajustaron con la ecuación de Hill:

$$y = V_{max} \left( \frac{x^k}{\text{EC}_{50}^k + x^k} \right)$$

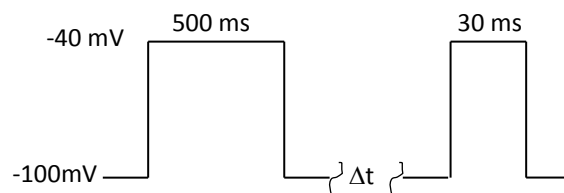
Donde  $y$  es la corriente inhibida normalizada;  $V_{max}$  es la inhibición máxima;  $x$  es la concentración del fármaco;  $k$  es el coeficiente de Hill y  $\text{EC}_{50}$  es la concentración del fármaco que produce el 50% del efecto total.

### Determinación del curso temporal de la inhibición de la corriente de sodio

Para determinar el tiempo de instalación del bloqueo del fármaco, se aplicó una serie de pulsos cuadrados a un potencial de -40 mV (potencial al cual se obtiene el pico de corriente), a partir de un potencial de sostenimiento de -100 mV, cada pulso espaciado 5 segundos, mientras se perfundía el fármaco hasta alcanzar la estabilización de la corriente. Posteriormente, se realizó el lavado con solución control de registro externa. Con los resultados se obtuvo la gráfica de corriente contra tiempo.

### Protocolo de recuperación de la inactivación

La recuperación de la inactivación de las corrientes de sodio se estudió aplicando un protocolo de doble pulso. La corriente de sodio es inactivada tras la aplicación de un pulso (pulso condicionante) con una duración de 500 ms al potencial en el que se obtiene la máxima amplitud de corriente, que fue de -40 mV, retornando al potencial de sostenimiento de -100 mV durante un periodo de tiempo variable antes de aplicar un segundo pulso (pulso de prueba) al mismo potencial pero con duración de 30 ms. Esta secuencia de pulso doble se repetirá aumentando la duración del tiempo entre el pulso condicionante y el pulso de prueba desde 1 hasta 10,000 ms ( $\Delta t = 1 - 10,000$  ms) y se obtendrá una gráfica de corriente contra tiempo.



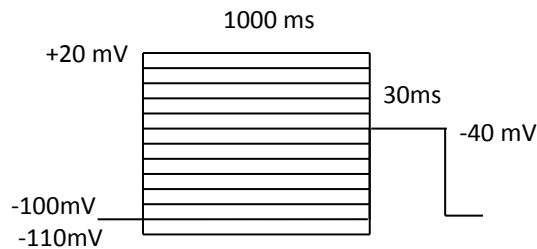
### Protocolo de inactivación de estado estable

Para analizar el efecto de la inactivación de estado estable, se utilizó un protocolo de doble pulso consistente en la aplicación de pulsos condicionantes desde -110 mV hasta +20 mV, con una duración de pulso de 1000 ms con incrementos de 10 mV.

Cada pulso condicionante es seguido de un pulso de prueba al potencial que genera la corriente máxima (-40 mV), con una duración de 30 ms. La inactivación de estado estable se obtuvo midiendo la magnitud del pico de la corriente generada por el pulso de prueba, graficada en función del potencial del pulso condicionante. Los datos normalizados fueron ajustados utilizando la ecuación de Boltzmann:

$$I/I_{max} = \frac{A_1}{1 + e^{\frac{(V-V_{1/2})}{k}}} + A_2$$

donde  $I/I_{max}$  es la corriente normalizada,  $V_{1/2}$  es el voltaje en el cual se alcanza el 50% de la corriente máxima,  $k$  es la pendiente,  $A_1$  es la amplitud de la relación y  $A_2$  es la amplitud del componente cuando no inactiva.



Los efectos sobre la conductancia al  $\text{Na}^+$  se analizaron calculando la  $g_{\text{Na}^+}$  a partir de los datos obtenidos de la relación corriente contra voltaje. Los puntos mostrados en las gráficas de conductancia se obtienen usando la siguiente ecuación:

$$g_{\text{Na}^+} = \frac{I_{\text{Na}^+}}{(E_m - E_{\text{Na}^+})}$$

donde  $g_{\text{Na}^+}$  es la conductancia de la membrana al  $\text{Na}^+$ ,  $I_{\text{Na}^+}$  es el pico de corriente correspondiente a cada valor del potencial de membrana ( $E_m$ ), y  $E_{\text{Na}^+}$  es el potencial de inversión del  $\text{Na}^+$  (se toma el valor experimental para el control y para el fármaco).

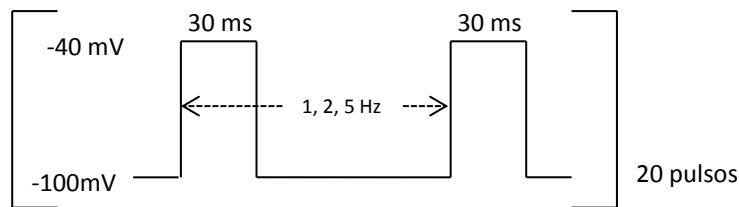
Los datos obtenidos fueron normalizados con respecto a la conductancia máxima ( $G_{max}$ ) y ajustados mediante la ecuación de Boltzmann:

$$G/G_{max} = \frac{A_1}{1 + e^{\frac{(V-V_{1/2})}{m}}} + A_2$$

donde  $G/G_{max}$  es la conductancia normalizada,  $V_{1/2}$  es el voltaje en el cual se alcanza el 50% de la conductancia máxima,  $m$  es la pendiente,  $A_1$  es la amplitud de la relación y  $A_2$  es la amplitud del componente cuando no activa.

#### Protocolo de dependencia de uso y frecuencia

Para este protocolo se aplicaron trenes de estimulación de 20 pulsos a -40 mV, y una duración de pulso de 30 ms, partiendo de un potencial de sostenimiento de -100 mV. Estos trenes de pulsos se aplicaron a tres diferentes frecuencias: 1Hz, 2Hz y 5Hz. Se construyeron tres gráficas, una con cada frecuencia, en las cuales se muestra la corriente contra el número de pulso.



## RESULTADOS

Los datos se presentan como la media  $\pm$  el error estándar de la media. Para evaluar los resultados de los registros electrofisiológicos antes y después de aplicar el fármaco se utilizó la prueba estadística  $t$  pareada. Se consideró que una diferencia era estadísticamente significativa cuando  $p < 0.05$ .

Los registros fueron realizados por medio de los programas computacionales pClamp 10.6 (Axon Instruments, LLC, CA, USA), mientras que, para la realización de las gráficas, análisis estadístico y ajustes se utilizaron los programas OriginPro 9.1 (OriginLab Corp. Northampton, MA, USA) y SigmaPlot 12.5 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

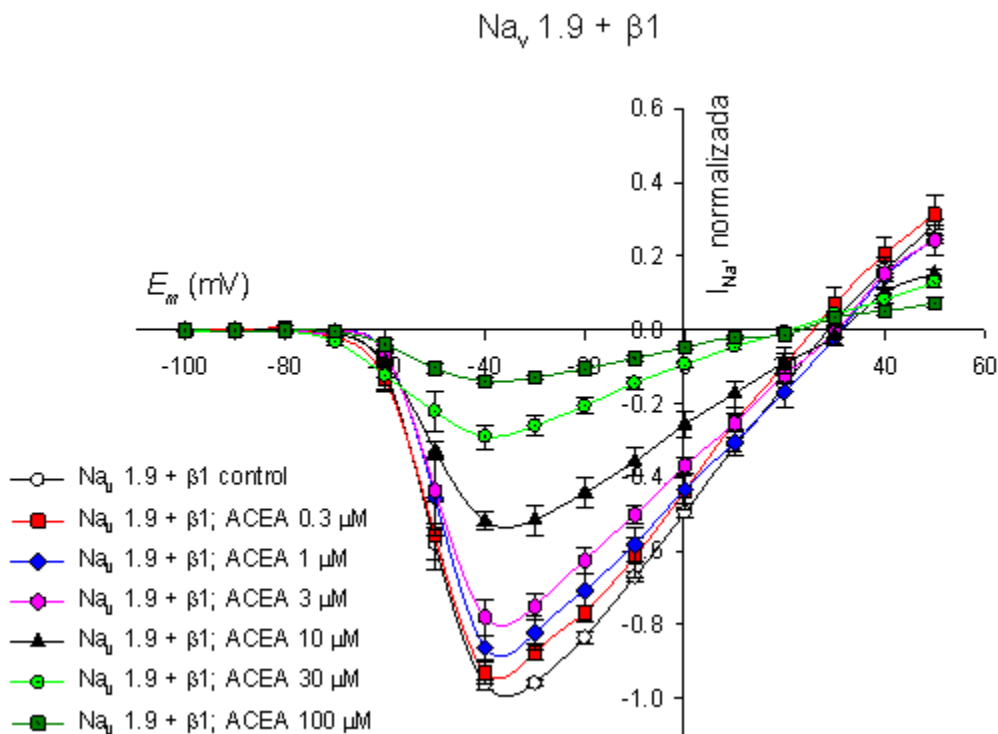
### Bloqueo dependiente de concentración.

Para determinar si el fármaco ACEA tiene un efecto dependiente de la concentración, se procedió a realizar una curva dosis-efecto. Se aplicaron las concentraciones de 0.3, 1, 3, 10, 30 y 100  $\mu\text{M}$  de ACEA y se observó que, a mayor concentración de ACEA, mayor porcentaje de bloqueo, es decir, el bloqueo es dependiente de la concentración. El bloqueo fue cuantificado como una reducción en la amplitud del pico de la corriente de sodio ( $I_{\text{Na}}$ ). En la tabla 3, se muestra el porcentaje de bloqueo obtenido con las diferentes concentraciones de fármaco.

Concentración de ACEA ( $\mu\text{M}$ )	Porcentaje de bloqueo +/- error estándar	n
0.3	6.85 % +/- 2.75	4
1	13.43 % +/- 3.18	4
3	21.95 % +/- 4.88	5
10	46.29 % +/- 2.51	5
30	71.00 % +/- 3.33	5
100	85.96 % +/- 0.72	4

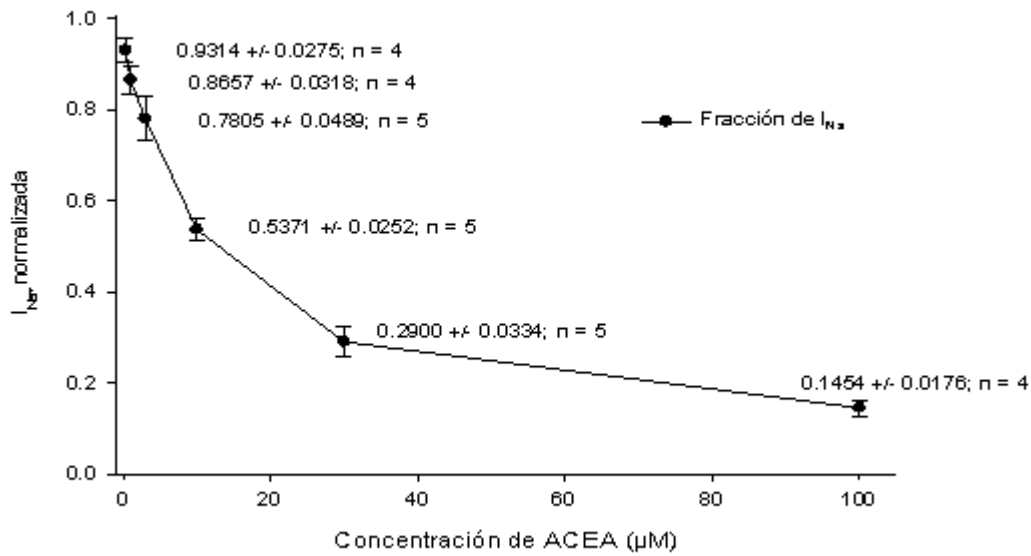
Tabla 3. Porcentaje de bloqueo en relación con la concentración de ACEA. Los resultados representan la media +/- el error estándar. La n es el número de experimentos efectuados

En la gráfica 1, se muestra la relación corriente contra voltaje para el canal  $hNa_v1.9 + \beta1$  en presencia de las diferentes concentraciones de ACEA, mientras que en la gráfica 2 se muestra la fracción de corriente de  $Na^+$  con respecto al control, en función de la concentración de ACEA. La medición de la fracción de corriente bloqueada se realizó después de 12 minutos del inicio de la perfusión del fármaco con el fin de que el efecto del fármaco alcanzara el estado estable, lo cual ocurría aproximadamente a los 10 minutos del inicio de la perfusión. A partir de estos resultados, se construyó una curva dosis-efecto (gráfica 3) y los datos se ajustaron con la ecuación de Hill de cual se obtiene que la  $EC_{50}$  es de  $12.04 \pm 2.4 \mu M$ , y un coeficiente de Hill de  $0.88 \pm 0.11$ , lo que se aproxima a una relación estequiométrica de uno a uno, esto es, prácticamente podemos decir que una molécula de ACEA interacciona con un canal  $hNa_v 1.9$ . Para los protocolos electrofisiológicos subsecuentes se utilizó la  $EC_{50}$ , es decir, la concentración de ACEA de  $12 \mu M$ .

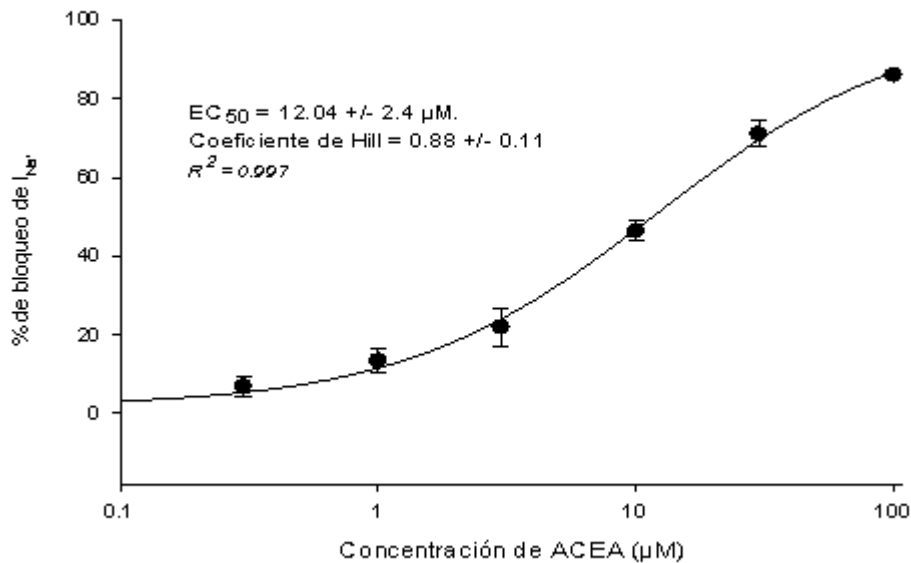


Gráfica 1. Relación corriente contra voltaje del canal de sodio  $Nav 1.9 + \beta 1$  en condiciones control y en presencia de ACEA a las concentraciones indicadas en el gráfico. Los datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar.

### Bloqueo de corriente dependiente de concentración



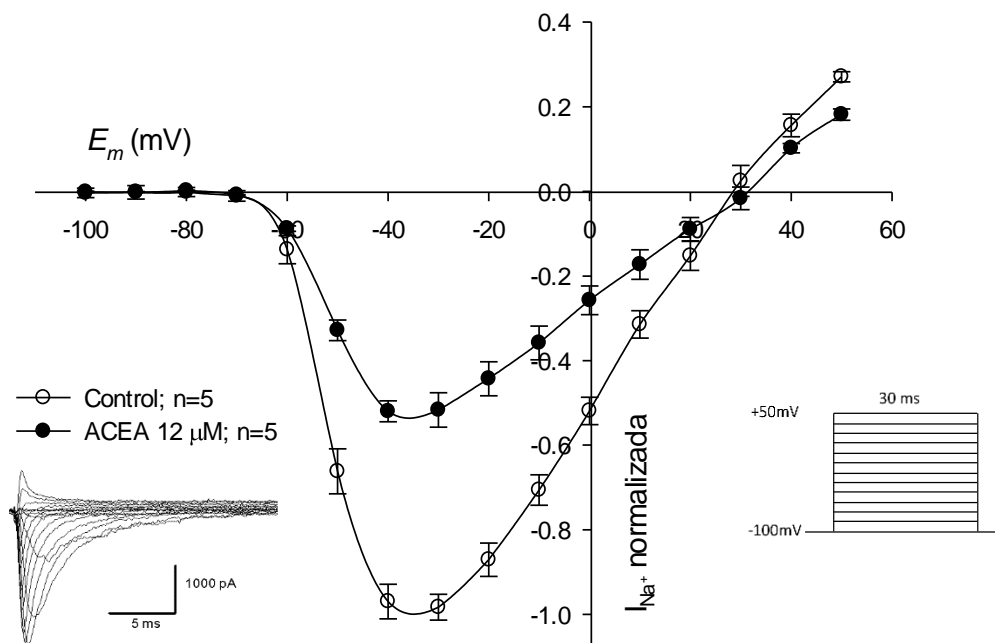
Gráfica 3. Efecto en la corriente de sodio pico en función de la concentración de ACEA. Los datos representan la fracción de corriente de sodio en el canal  $\text{Nav } 1.9 + \beta 1$ .



Gráfica 2. Curva dosis-efecto. Los datos se presentan como el porcentaje de bloqueo de la  $I_{Na}$  del canal  $\text{Nav } 1.9 + \beta 1$  en función de la concentración de ACEA (0.3, 1, 3, 10, 30, 100  $\mu\text{M}$ ). Los datos se ajustaron a una ecuación de Hill con los siguientes parámetros:  $\text{EC}_{50} = 12.04 \pm 2.4 \mu\text{M}$  y coeficiente de Hill =  $0.88 \pm 0.11$ .

## Relación corriente contra voltaje.

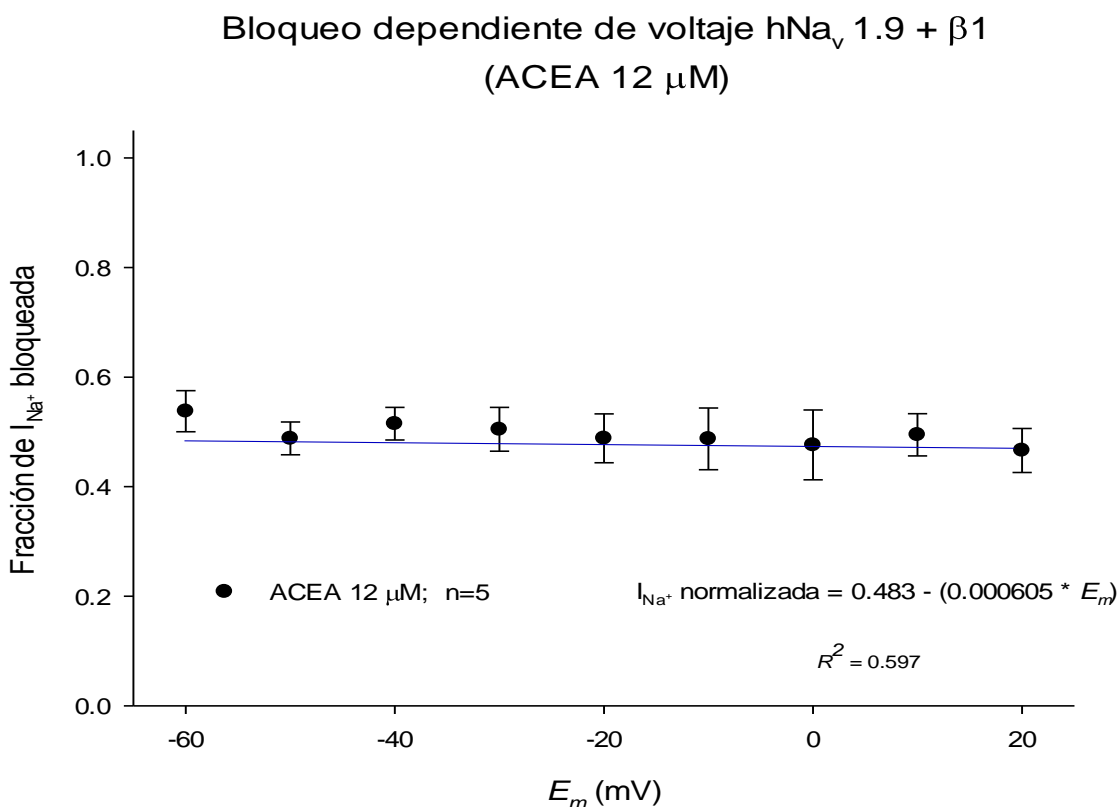
En condiciones control, la relación corriente contra voltaje del canal  $\text{Na}_v 1.9 + \beta 1$  indica que el canal empieza a activarse a partir de  $-70 \text{ mV}$  aproximadamente, registrando un pico de corriente alrededor de  $-40 \text{ mV}$  y un potencial de inversión en torno a los  $+30 \text{ mV}$ . La relación corriente contra voltaje fue construida midiendo la magnitud de las corrientes al pico generadas en cada paso de voltaje, posteriormente se graficaron en función del potencial de membrana. En la gráfica 4 se puede apreciar que la ACEA no desplazó el pico de corriente, ni modificó el potencial de inversión de la corriente de manera significativa.



Gráfica 4. Relación corriente contra voltaje del canal de sodio  $\text{Na}_v 1.9 + \beta 1$  en condiciones control y en presencia de  $12 \mu\text{M}$  de ACEA. La gráfica fue construida utilizando el protocolo que se muestra en el inserto de la derecha. Nótese que la ACEA no genera un desplazamiento del voltaje del pico de la corriente, así como tampoco modifica el potencial de inversión de la corriente de manera significativa. En el inserto de la izquierda se muestra un trazo crudo representativo de la corriente de sodio contra el tiempo en condiciones control.

## Bloqueo dependiente de voltaje.

Para determinar si la ACEA (12  $\mu\text{M}$ ) produce un bloqueo dependiente de voltaje, se procedió a calcular la proporción de corriente bloqueada por el fármaco en el rango de potencial de membrana desde -60 mV hasta +20 mV. En la gráfica 5 podemos observar que la proporción de bloqueo se mantiene prácticamente constante (cerca del 50%) en todo el rango de voltaje, es decir, la pendiente de la recta (azul) obtenida por regresión lineal es casi cero, lo que significa que la ACEA no ejerce un bloqueo dependiente de voltaje.



Gráfica 5. Bloqueo dependiente de voltaje. Se muestra la fracción de bloqueo de la corriente de sodio al aplicar 12  $\mu\text{M}$  de ACEA en un rango de -60 mV hasta +20 mV. Se muestra la ecuación de la recta (azul) obtenida por regresión lineal en la que se puede ver que la pendiente es prácticamente cero, por lo que la fracción de bloqueo se mantiene constante en torno a 0.483.

## Inactivación de estado estable y conductancia.

Se analizó el efecto de la ACEA sobre la inactivación de estado estable, empleando para ello el protocolo de doble pulso descrito en materiales y métodos. Para la obtención de las gráficas se procedió a medir la magnitud del pico de la corriente ocasionada por el pulso de prueba y se graficaron en función del potencial del pulso condicionante. Posteriormente, se normalizaron los datos obtenidos y fueron ajustados empleando la ecuación de Boltzmann:

$$I/I_{max} = \frac{A_1}{1 + e^{\frac{(V-V_{1/2})}{k}}} + A_2$$

Los parámetros obtenidos mediante el ajuste, previamente descritos en la sección de Materiales y Métodos, se presentan en tabla 4.

Como se puede apreciar en la gráfica 6, el fármaco desplazó significativamente la curva de inactivación de estado estable hacia potenciales hiperpolarizantes (16.55 mV de desplazamiento), pero no modificó significativamente la pendiente  $k$ .

Los efectos sobre la conductancia al  $Na^+$  se analizaron calculando la conductancia ( $g_{Na^+}$ ) a partir de los datos obtenidos de la relación corriente contra voltaje mostrada en la gráfica 4. La conductancia fue calculada con los valores experimentales del potencial de inversión para cada célula, a través de la ecuación para la conductancia:

$$g_{Na^+} = \frac{I_{Na^+}}{(E_m - E_{Na^+})}$$

Los valores obtenidos fueron normalizados con respecto a la conductancia máxima ( $G_{max}$ ) y ajustados mediante la ecuación de Boltzmann:

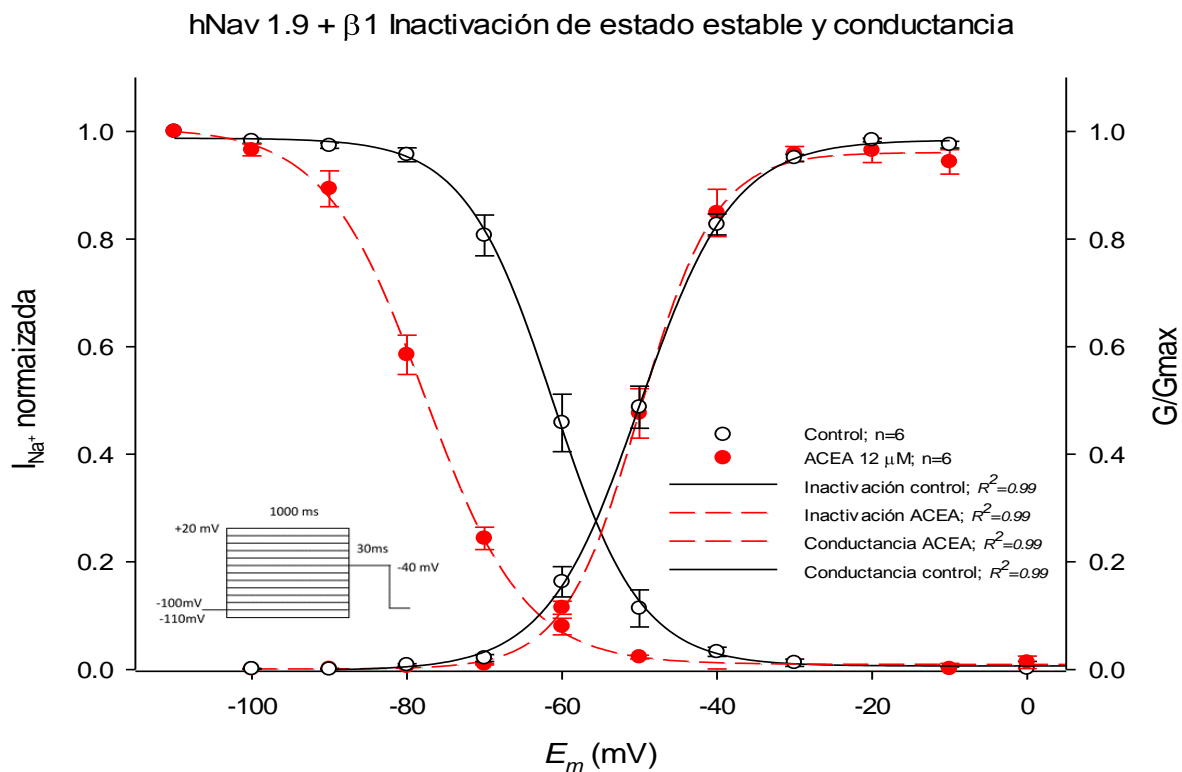
$$G/G_{max} = \frac{A_1}{1 + e^{\frac{(V-V_{1/2})}{m}}} + A_2$$

Los parámetros obtenidos del ajuste (descritos en la sección de Materiales y Métodos) se presentan en la tabla 4.

La ACEA no produjo desplazamiento de manera significativa en la curva de conductancia, así como tampoco produjo un cambio significativo en la pendiente  $m$ , tal como se puede apreciar en la gráfica 6.

Condición	Inactivación de estado estable		Conductancia	
	$V_{1/2}$	$k$	$V_{1/2}$	$m$
Control	-61.16 +/- 0.25 (mV)	-5.68 +/- 0.22	-49.98 +/- 0.17 (mV)	6.03 +/- 0.16
ACEA 12 $\mu$ M	-77.71 +/- 0.44 (mV) ***	-6.45 +/- 0.38	-49.94 +/- 0.21 (mV)	4.88 +/- 0.28

Tabla 4. Parámetros de inactivación de estado estable y conductancia del canal de sodio hNav1.9 +  $\beta$ 1 en presencia y ausencia de 12  $\mu$ M de ACEA. Estos valores fueron obtenidos después de realizar el ajuste a la ecuación de Boltzmann y representan el promedio +/- el error estándar. Nótese el corrimiento significativo de  $V_{1/2}$  de la inactivación de estado estable hacia potenciales hiperpolarizantes. En el resto de los parámetros no hubo cambios estadísticamente significativos. \*\*\*:  $p < 0.001$ .



Gráfica 6. Curvas de inactivación de estado estable y conductancia del canal de sodio hNav1.9 +  $\beta$ 1 en presencia y ausencia de 12  $\mu$ M de ACEA. El único cambio significativo al aplicar el fármaco se observó en el desplazamiento de la curva de inactivación hacia potenciales hiperpolarizantes, tomando como referencia el voltaje medio de la inactivación de -61.16 mV +/- 0.25 para el control, hasta -77.71 mV +/- 0.44 para el caso del fármaco ( $p < 0.001$ ). En el resto de los parámetros no hubo cambios significativos, mismos que se presentan en la tabla 4. El inserto muestra el protocolo utilizado para la curva de inactivación de estado estable.

## Corriente de ventana.

Cuando existe una superposición entre la curva de activación y la curva de inactivación, entonces podrá generarse una corriente generalmente de pequeña amplitud en el área de traslape llamada corriente de ventana, la cual puede tener implicaciones fisiológicas importantes dependiendo del área de traslape, como la generación de postpotenciales tempranos que ocurren poco después de haberse iniciado un potencial de acción.

Para evaluar el área de traslape se calculó, para cada célula, la integral de la curva de activación (conductancia) evaluada desde un potencial de -100 mV hasta el potencial donde se intersecta con la curva de inactivación de estado estable, más la integral de la curva de inactivación de estado estable evaluada desde el potencial del punto de intersección con la curva de activación hasta 0 mV. Dado que, tanto la curva de activación como la curva de inactivación fueron ajustadas a ecuaciones de Boltzmann, éstas sirvieron de base para el cálculo de las integrales mencionadas. A manera de ejemplo, a continuación se indican las integrales evaluadas tomando los datos promedio tanto del control como en presencia del fármaco.

Ecuación para la conductancia en el caso del control:

$$y = 0.0015 + \frac{0.9856}{1 + e^{-(x+49.98)/6.026}}$$

Ecuación para la inactivación de estado estable en el caso de control:

$$y = 0.0066 + \frac{0.9807}{1 + e^{-(x+61.157)/-5.676}}$$

Ecuación para el cálculo del área bajo la curva en el caso control:

$$A = \int_{-100}^{-55.67} 0.0015 + \frac{0.9856}{1 + e^{-(x+49.98)/6.026}} dx + \int_{-55.67}^0 0.0066 + \frac{0.9807}{1 + e^{-(x+61.157)/-5.676}} dx$$

$$A = 4.178$$

Ecuación para la conductancia en presencia de 12  $\mu\text{M}$  de ACEA:

$$y = 0.0009 + \frac{0.9598}{1 + e^{-(x+49.94)/4.885}}$$

Ecuación para la inactivación de estado estable en presencia de 12  $\mu\text{M}$  de ACEA:

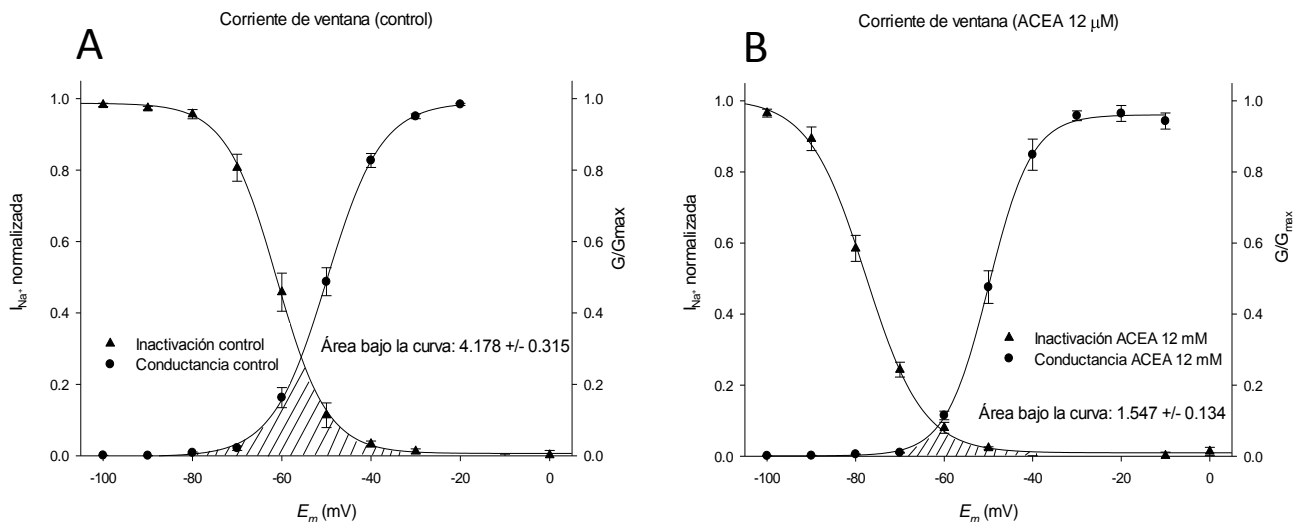
$$y = 0.0096 + \frac{0.9966}{1 + e^{-(x+77.71)/-6.453}}$$

Ecuación para el cálculo del área bajo la curva en presencia de 12  $\mu\text{M}$  de ACEA:

$$A = \int_{-100}^{-61.51} 0.0009 + \frac{0.9598}{1 + e^{-(x+49.94)/4.885}} dx + \int_{-61.51}^0 0.0096 + \frac{0.9966}{1 + e^{-(x+77.71)/-6.453}} dx$$

$$A = 1,547$$

En la gráfica 7 se puede observar que el área de empalme o traslape entre la curva de activación y la curva de inactivación de estado estable es significativamente mayor ( $p < 0.001$ ) en condiciones control (A) que en presencia de 12  $\mu\text{M}$  de ACEA (B), siendo estas áreas de 4.178  $\pm$  0.315 y 1.547  $\pm$  0.134 respectivamente.

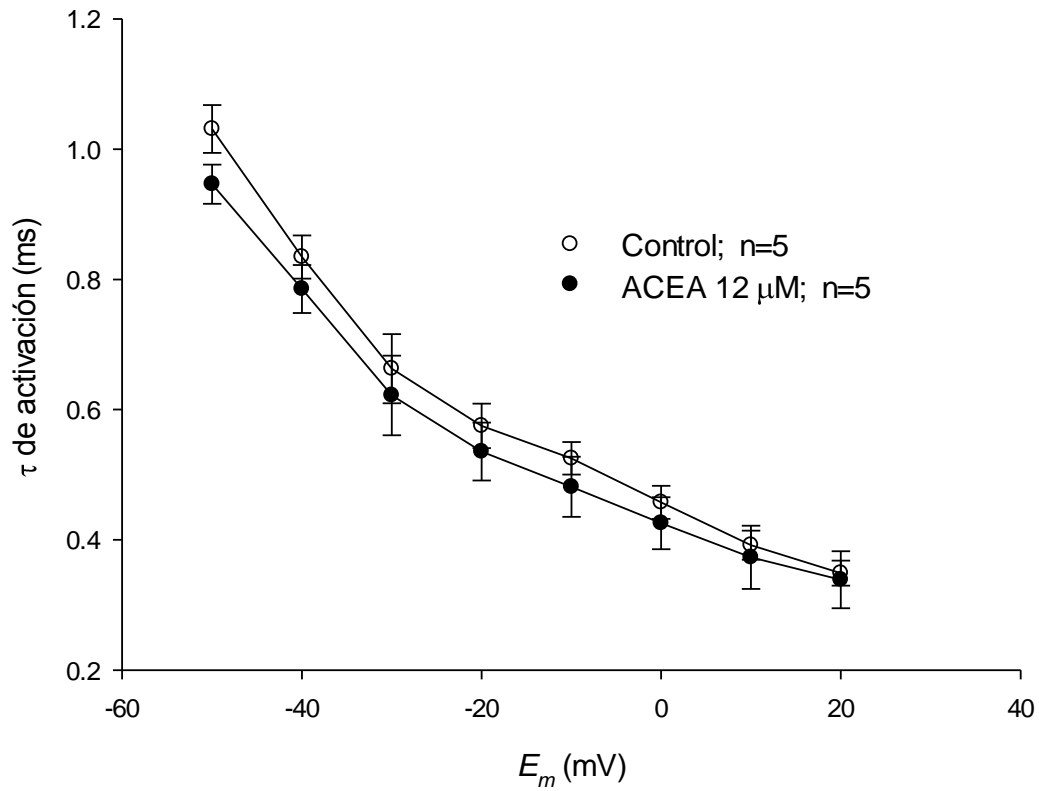


Gráfica 7. Área bajo la curva (área sombreada) generada por el traslape de las curvas de activación e inactivación que, eventualmente, han de generar las llamadas "corrientes de ventana", cuya magnitud es proporcional al área de traslape. En condiciones control (A), el área calculada es de 4.178 +/- 0.315, mientras que, al aplicar 12  $\mu$ M de ACEA (B), el área se redujo a 1.547 +/- 0.134. Esta diferencia es estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ).

### Cinética de activación.

Para evaluar el crecimiento de la corriente de sodio, es decir, la cinética de activación, se utilizaron los datos correspondientes a los tiempos requeridos para alcanzar los picos de corriente, los cuales fueron obtenidos con el protocolo de activación (que fue empleado para la construcción de la gráfica corriente contra voltaje), tanto en condiciones control como en presencia del 12  $\mu$ M de ACEA. Los datos del crecimiento de la corriente para los diferentes potenciales aplicados se ajustaron a una ecuación exponencial simple y se calcularon las respectivas constantes de activación ( $\tau$ ). En la gráfica 8 se observa que no existe diferencia significativa en las  $\tau$  de activación en ausencia y presencia del fármaco.

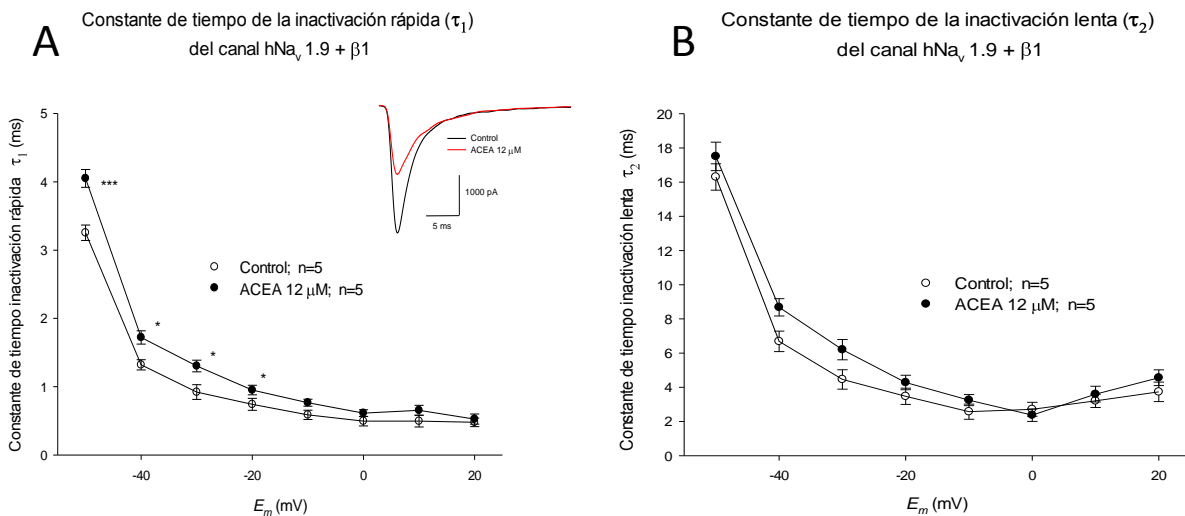
### Cinética de activación del canal $hNa_v 1.9 + \beta 1$



Gráfica 8. Cinética de activación del canal  $hNa_v 1.9 + \beta 1$ . Se muestra la relación entre el potencial de membrana ( $E_m$ ) y la constante de tiempo de activación ( $\tau$ ) en condiciones control y tras la aplicación de  $12\mu$ M de ACEA. Los datos muestran que no existe diferencia estadísticamente significativa para cualquier potencial.

## Cinética de inactivación.

El decaimiento de la corriente de sodio, es decir, la cinética de inactivación, medida desde el pico máximo hasta el momento en que prácticamente ha desaparecido, presentó una fase o componente rápido y otro lento, por lo que los datos fueron ajustados a una ecuación de doble exponencial, tanto en condiciones control como en presencia del fármaco. En la gráfica 9 se muestran las constantes de tiempo ( $\tau_1$  y  $\tau_2$ , rápida y lenta respectivamente) en función del potencial de membrana ( $E_m$ ), tanto en condiciones control como en presencia de 12  $\mu\text{M}$  de ACEA. En el rango de -50 mV a -20 mV, la  $\tau_1$  de inactivación rápida (A) es significativamente mayor en presencia del fármaco que en condiciones control, lo que indica que el proceso de inactivación rápido se enlentece con ACEA. Para potenciales mayores a -20 mV, no hay diferencias significativas. En el caso de la  $\tau_2$  de inactivación lenta (B), no se encontraron diferencias significativas en todo el rango de potenciales de membrana evaluados.



Gráfica 9. Cinética de inactivación. Los datos se ajustaron a una doble exponencial con una constante de tiempo ( $\tau_1$ ) rápida (A) y una constante de tiempo ( $\tau_2$ ) lenta (B). Se puede observar que la inactivación rápida (A) se enlentece de manera significativa a un potencial de membrana en el rango de -50 mV a -20 mV, es decir, la  $\tau_1$  es significativamente mayor a estos potenciales en presencia de 12  $\mu\text{M}$  de ACEA que en condiciones control. La inactivación lenta (B), es decir, la  $\tau_2$  no presenta cambios significativos en todo el rango de potenciales evaluados. En el inserto se muestra un trazo crudo de corriente contra tiempo generado a un potencial de -40 mV en condición control y con 12  $\mu\text{M}$  de ACEA. \*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$

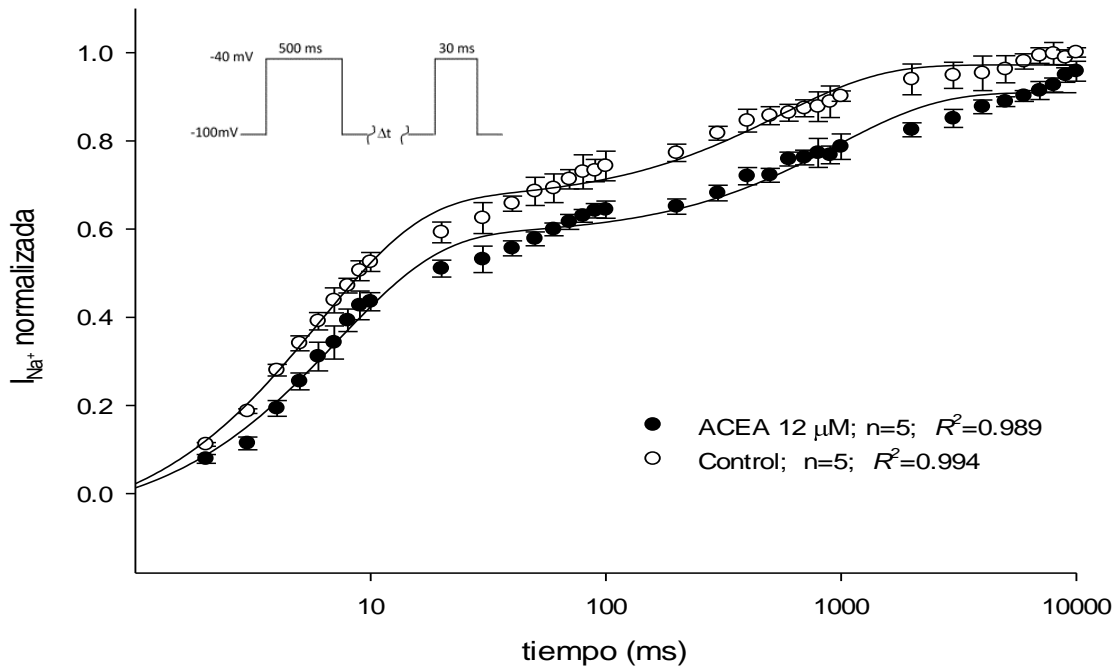
## Curso temporal de la recuperación de la inactivación.

La recuperación de la inactivación del canal de sodio no se vio modificada en presencia de 12  $\mu\text{M}$  de ACEA (gráfica 10). La cinética de recuperación de la inactivación fue ajustada a una ecuación doble exponencial del tipo:

$$y = y_0 + a(1 - e^{-\frac{t}{\tau_1}}) + c(1 - e^{-\frac{t}{\tau_2}})$$

Donde  $t$  es el tiempo que transcurre entre el pulso condicionante y el pulso de prueba de acuerdo al protocolo de doble pulso que se explica en la sección Materiales y Métodos;  $\tau_1$  y  $\tau_2$  son las constantes de tiempo de recuperación rápida y lenta respectivamente, cuyos valores calculados se muestran en la tabla 5.

### Recuperación de la inactivación del canal $\text{hNa}_v 1.9 + \beta 1$



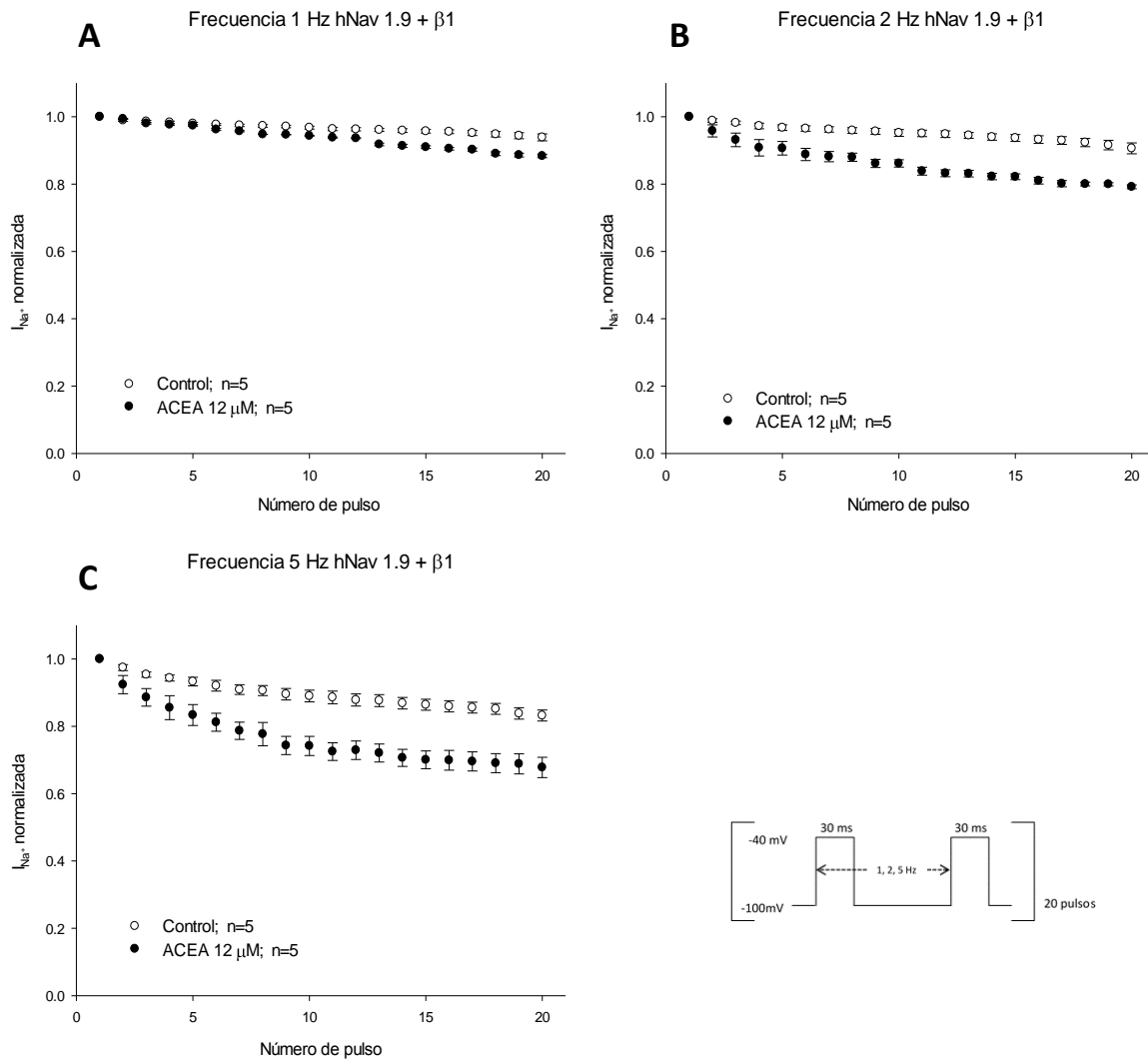
Gráfica 10. Recuperación de la inactivación. Los datos fueron ajustados a una exponencial doble. Tanto la recuperación rápida ( $\tau_1$ ) como la recuperación lenta ( $\tau_2$ ) no presentaron diferencias estadísticamente significativas en ausencia y presencia del fármaco. El inserto corresponde al protocolo empleado para la obtención de los datos de esta curva.

Condición	$\tau_1$	$\tau_2$
Control	6.206 +/- 0.589 (ms)	559.27 +/- 66.75 (ms)
ACEA 12 $\mu$ M	6.463 +/- 0.324 (ms)	746.62 +/- 54.81 (ms)

Tabla 5. Recuperación de la inactivación. Se muestran las constantes de tiempo  $\tau_1$  y  $\tau_2$  para la recuperación rápida y lenta respectivamente, tanto en condiciones control como en presencia de 12  $\mu$ M de ACEA. El resultado del análisis estadístico indica que no existen diferencias significativas para ninguna de las dos constantes de tiempo

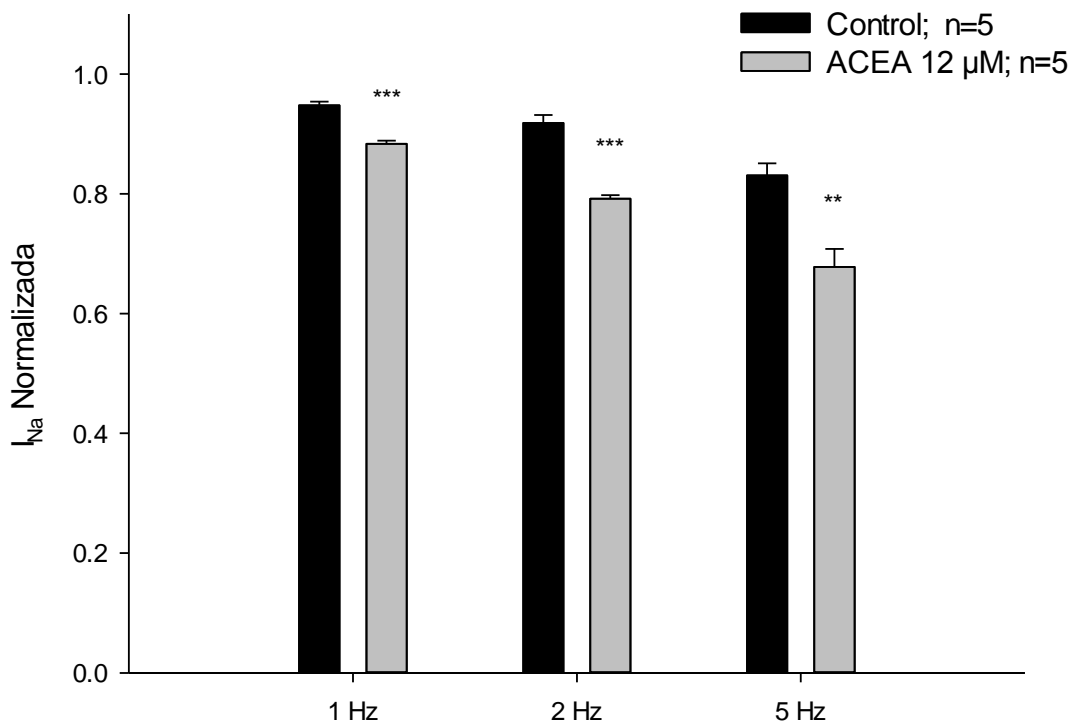
### Bloqueo dependiente de uso y frecuencia.

El protocolo utilizado para el estudio de la dependencia de uso y frecuencia, consistió en un tren de 20 pulsos a diferentes frecuencias (1, 2 y 5 Hz), en el cual, se midió la proporción de corriente generada en el pulso 20 ( $P_{20}$ ) con respecto a la corriente generada en el pulso uno ( $P_1$ ) para cada una de las frecuencias de estimulación. En la gráfica 11 se presentan los resultados del experimento, tanto en condiciones control como en presencia de 12  $\mu$ M de ACEA. A una frecuencia de 1 Hz (A), el porcentaje de bloqueo al pulso 20 fue de 5.22% +/- 0.61 en condición control; mientras que en presencia del fármaco fue de 11.64 % +/- 0.51. A 2 Hz de frecuencia (B), el bloqueo en el caso control fue de 8.17% +/- 1.31; y de 20.81% +/- 0.57 en presencia del fármaco. Finalmente, a una frecuencia de 5 Hz (C), en condiciones control el bloqueo fue de 16.93 % +/- 2.00; mientras que en presencia del fármaco fue de 32.21 % +/- 3.00. En los tres casos, las diferencias fueron estadísticamente significativas, lo que se observa con mayor claridad en el gráfico de barras (gráfica 12). Estos datos sugieren que la presencia del fármaco produce una mayor acumulación de la inactivación a medida que aumenta la frecuencia de estimulación.



Gráfica 11. Dependencia de uso y frecuencia. Las gráficas muestran el efecto en las corrientes de sodio cuando el canal se estimula a las frecuencias de 1 Hz (A), 2 Hz (B) y 5 Hz (C) en condiciones control y en presencia de 12  $\mu$ M de ACEA. Nótese que el fármaco produce un aumento en la acumulación de la inactivación a medida que aumenta la frecuencia de estimulación. El inserto corresponde al protocolo empleado para este experimento.

## Bloqueo dependiente de uso y frecuencia $hNa_v 1.9 + \beta 1$

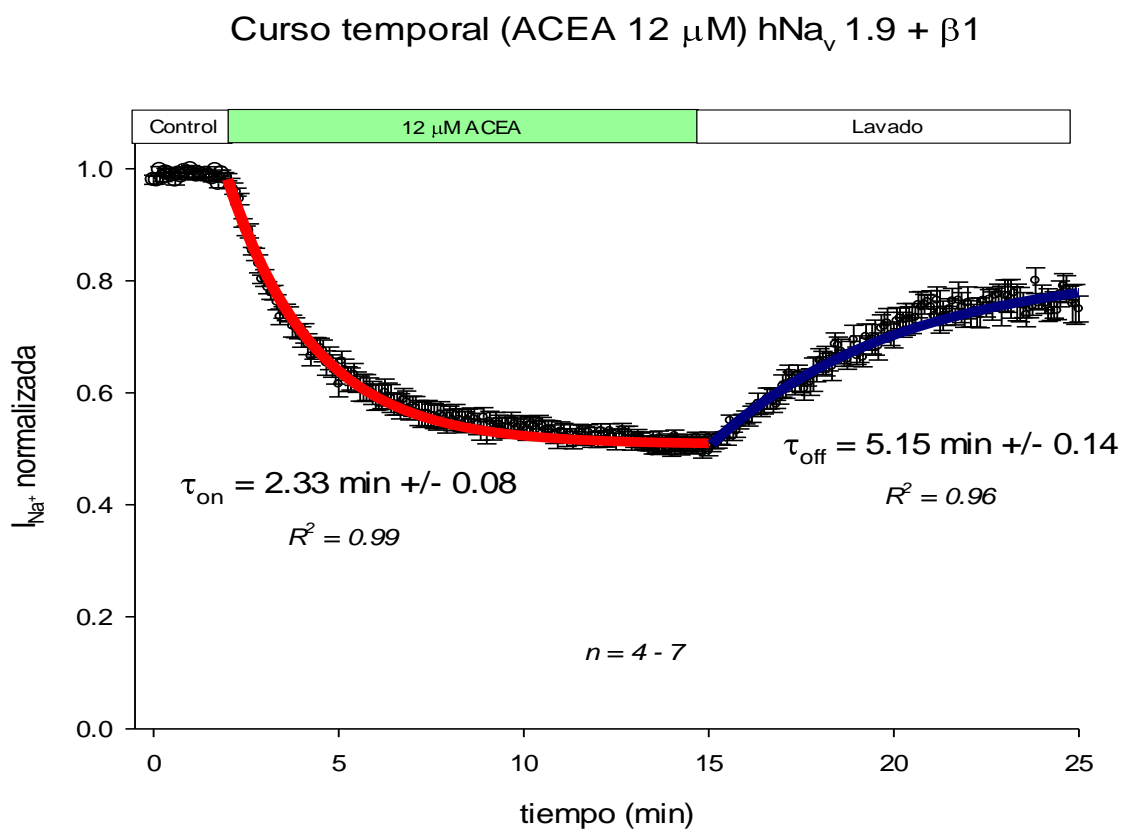


Gráfica 12. Comparación del efecto de bloqueo de la corriente de sodio en condiciones control y en presencia de 12  $\mu$ M de ACEA a diferentes frecuencias de estimulación (1 Hz, 2 Hz y 5 Hz). En los tres casos las diferencias son estadísticamente significativas. \*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$ .

### Curso temporal de la inhibición de la corriente de sodio.

Para determinar el tiempo de instalación del bloqueo del fármaco, se aplicó un protocolo consistente en una serie de pulsos cuadrados a un potencial de -40 mV, a partir de un potencial de sostenimiento de -100 mV, cada pulso espaciado 5 segundos, mientras se perfundía el fármaco hasta alcanzar la estabilización de la corriente. Posteriormente, se realizó el lavado con solución control de registro externa. Previo a la perfusión del fármaco, se aplicó el protocolo en condiciones control durante 2 minutos. Con los resultados se obtuvo la gráfica de corriente contra tiempo cuyos datos se ajustaron a una exponencial simple del tipo  $y = y_0 + Ae^{-t/\tau}$ , tanto en el caso de la instalación del efecto del fármaco como en el caso del lavado

del mismo, y se calcularon las constantes de tiempo de instalación ( $\tau_{on}=2.33$  min) y de disociación ( $\tau_{off}= 5.15$  min) del fármaco (gráfica 13).



Gráfica 13. Curso temporal de la instalación y disociación del fármaco. Como en los experimentos anteriores, se utilizó la  $EC_{50}$  de ACEA (equivalente a 12  $\mu$ M). Los datos se ajustaron a una exponencial simple, tanto para la fase de instalación del efecto del fármaco (línea roja), como para la fase de lavado (línea azul). Las constantes de tiempo calculadas fueron  $\tau_{on} = 2.33 \text{ min } \pm 0.08$  y  $\tau_{off} = 5.15 \text{ min } \pm 0.14$  respectivamente.

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha podido demostrar que la ACEA suprime las corrientes de sodio del canal  $hNa_v 1.9 + \beta 1$  de manera dependiente de concentración, siendo la  $EC_{50}$  de 12  $\mu M$ . Cabe mencionar que el bloqueo dependiente de concentración también lo presenta la anandamida, cuya estructura química es muy similar a la ACEA, lo cual fue publicado por Okura y colaboradores en el 2014, quienes trabajaron con los canales  $Na_v 1.2, 1.6, 1.7$  y  $1.8$ .

Con respecto a la relación corriente contra voltaje se observó que el canal empieza a activarse a partir de -70 mV aproximadamente, registrando un pico de corriente alrededor de -40 mV, tanto en condiciones control como en presencia del fármaco, es decir, la ACEA no desplazó el pico de corriente, ni modificó el umbral de activación. Al evaluar la fracción de corriente bloqueada por el fármaco a diferentes potenciales (desde -60 mV hasta + 20 mV), vemos que su efecto no es dependiente de voltaje, ya que se mantiene constante en todo el rango.

El efecto de la ACEA sobre la activación y la inactivación se vio reflejado únicamente en el desplazamiento de 16.55 mV de la curva de inactivación hacia potenciales más hiperpolarizantes, manteniéndose prácticamente intacta la curva de activación. Al desplazarse la dependencia de voltaje de la inactivación hacia valores más negativos, se tendrán menos canales disponibles para abrirse a un determinado voltaje. Por lo que, este resultado sugiere que el desplazamiento de la curva de inactivación hacia valores hiperpolarizantes es un mecanismo para la reducción de las corrientes de sodio por la ACEA en el canal  $hNa_v 1.9$ . Esto mismo se puede apreciar gráficamente al ver cómo se reduce el área de traslape de las curvas de activación e inactivación, es decir, la ACEA genera una reducción de las corrientes de ventana. En general, el término "corriente de ventana" se utiliza para describir una pequeña corriente de sodio que se puede ver en una "ventana" de voltajes (rango de voltajes) donde las curvas de activación e inactivación de estado estable se traslapan. Las curvas de activación e inactivación representan las densidades de probabilidad de que los canales estén en el estado activado (abierto) o en estado inactivado (no conductor). Dentro la ventana, la curva de inactivación indica que la

mayoría de los canales de sodio están inactivados; la pequeña fracción de canales que no estén inactivados estaría en estado de reposo cerrado. La curva de activación superpuesta que forma la ventana significa que existe una probabilidad, pequeña pero real, de que cualquier canal de sodio en reposo, no inactivado puede abrirse espontáneamente a estos voltajes. Dada la pequeña fracción de canales no inactivados dentro de la ventana y la pequeña probabilidad de que alguno de estos canales se abra, es probable que sólo unos pocos canales se abran en algún momento, y la cantidad de canales que consigan abrirse fluctuará. Es la corriente neta que estos pocos canales abiertos llevan de momento a momento lo que define la "corriente de ventana" (Frenz et al., 2014). En el canal hNav 1.9 estas corrientes de ventana se encuentran aproximadamente en un rango de potenciales de -80 mV a -30 mV para el caso control y de -80 mV a -40 mV en presencia del fármaco. Esto es, se encuentran en torno al potencial de membrana en reposo (-60 mV aprox.), por lo que estas corrientes estarían contribuyendo a la reducción del umbral de activación. Así, algunos potenciales subumbrales podrían alcanzar a disparar un potencial de acción en aquellas neuronas que cuenten con este tipo de canal. Por lo anterior, al reducirse estas corrientes de ventana, la ACEA podría estar contribuyendo a la disminución de la propagación de señales nociceptivas.

En cuanto a la cinética de activación, no hubo cambios significativos, sin embargo, en relación a la cinética de inactivación, la ACEA produjo un aumento pequeño pero significativo en la constante de tiempo de la inactivación rápida (menor a 0.8 ms en el rango de -50 mV a -20 mV), lo que implica un discreto enlentecimiento de la inactivación rápida. La inactivación lenta no tuvo diferencias significativas. Lo más llamativo aquí es la rápida inactivación que presentó el canal. Como se mencionó anteriormente, el hNav 1.9 se caracteriza, entre otras cosas, por una muy lenta inactivación, lo que contrasta con los resultados obtenidos. Esto nos llevó a preguntarnos si en verdad se trataba del canal en cuestión y para corroborar que se trataba del canal hNav 1.9, se procedió a secuenciar dos fragmentos del canal y, al realizar el alineamiento, confirmamos que se trataba del hNav 1.9 (ver anexo A). Es importante considerar que estamos empleando un sistema heterólogo diferente a los sistemas que más han sido empleados por otros investigadores para el estudio de

este canal (DRG, células HEK-293, ovocitos). Además de ello, se realizó la cotransfección del hNav 1.9 con la subunidad  $\beta 1$ . En este sentido, ambos aspectos son de suma importancia puesto que la biofísica de los canales de sodio dependientes de voltaje puede variar de un sistema de expresión a otro, así como la subunidad beta puede conferirle al canal una biofísica diferente ya que, en general, la subunidad alfa de diferentes isoformas de los canales de sodio coexpresada con la subunidad  $\beta 1$  da como resultado algunos cambios como una mayor expresión del canal y la aceleración de la inactivación (Tan, J. et al., 2011). Por otro lado, en virtud de la dificultad para lograr una adecuada expresión del canal hNav 1.9 en sistemas heterólogos, varios investigadores han probado diferentes metodologías para superar este obstáculo y se ha observado que las propiedades biofísicas del canal muestran diferencias importantes de un sistema a otro. Por ejemplo, Oliver Goral en el 2015 sustituyó el carboxilo terminal del canal hNav 1.9 por el carboxilo terminal del canal rNav 1.4, y lo probó tanto en ovocitos de *Xenopus laevis* como en células HEK 293T y ND7/23. En todos estos sistemas la expresión se mejoró notablemente y la inactivación se aceleró de manera muy importante, sin embargo, el pico de corriente en las células HEK se dio a -40 mV, mientras que en los ovocitos se obtuvo en torno a -15 mV (Goral et al., 2015). Por su parte, Xi Zhou en 2017 fusionó la proteína verde fluorescente con el carboxilo terminal del hNav 1.9 logrando una mayor expresión del canal pero también una aceleración de la inactivación en células ND7/23. Por lo tanto, las diferencias en la biofísica del canal que nosotros observamos, podrían deberse al propio sistema de expresión (células CHO-K1), o a un mayor efecto en la modulación por parte de la subunidad  $\beta 1$ , o a alguna recombinación o splicing alternativo que sufriera el gen dentro de la célula CHO-K1 que pudiera emular el efecto observado al modificar el carboxilo terminal del canal.

En cuanto al curso temporal de la recuperación de la inactivación, la ACEA mostró un ligero enlentecimiento tanto del componente rápido como del componente lento, sin embargo, estos cambios no son significativos.

En donde sí se encontraron cambios significativos, fue en el bloqueo dependiente de uso y frecuencia, ya que la ACEA mostró una diferencia del porcentaje de bloqueo con respecto al control de 6.42%, 12.64% y 15.28% cuando la estimulación fue de 1

Hz, 2Hz y 5 Hz respectivamente. Estos datos sugieren que el fármaco tiene afinidad por el canal en estado inactivado.

En la gráfica del curso temporal de la instalación del fármaco, observamos que el tiempo requerido para obtener el efecto es de aproximadamente 10 minutos (del ajuste a una exponencial simple obtenemos una  $\tau_{on} = 2.33$  minutos). Este dato, aunado al carácter liposoluble de la ACEA (coeficiente de partición  $\log P_{o/w} = 6.6$ ), sugieren que este fármaco ejerza su efecto desde el poro interno del canal atravesando la membrana celular. Si el efecto de bloqueo se llevara a cabo desde el poro externo, sería razonable pensar que dicho efecto se instalara más rápido. En relación al lavado o disociación del fármaco, se observa que no se logró una recuperación total, aunque el gráfico muestra una tendencia que apunta a esa dirección. Extrapolando los datos, se esperaría que la recuperación completa se alcanzara en poco más de 20 minutos a partir de iniciado el lavado (tomando en cuenta que el ajuste de los datos a una exponencial simple nos da una  $\tau_{off} = 5.15$  minutos), pero con los datos obtenidos, no es posible llegar a esa conclusión, pues existe también la posibilidad de que la recuperación parcial que se observó, se deba a la carencia de enzimas que degraden el fármaco al interior de la célula. Lo anterior, partiendo del supuesto de que el fármaco realmente entrara a la célula para ejercer su efecto.

## CONCLUSIONES

La ACEA produce un bloqueo dependiente de concentración, pero no dependiente de voltaje, sobre la corriente de sodio del canal  $hNa_v 1.9 + \beta 1$ .

Una concentración de 12  $\mu\text{M}$  de ACEA genera un bloqueo de aproximadamente el 50% ( $EC_{50}$ ) de la corriente de sodio del canal y 86% de bloqueo a 100  $\mu\text{M}$ . El ajuste de los datos de la relación concentración-efecto nos da un número de Hill de 0.88 +/- 0.11.

La ACEA no desplaza el pico de corriente, así como tampoco modifica el umbral de activación ni el potencial de inversión.

La ACEA desplaza significativamente el  $V_{1/2}$  de la inactivación de estado estable hacia potenciales hiperpolarizantes, manteniendo sin cambio la pendiente ( $k$ ) de la curva. A su vez, no produce cambios significativos en el  $V_{1/2}$  de activación, ni en su pendiente ( $m$ ).

La ACEA disminuye las corrientes de ventana, por lo que es posible que por este mecanismo, el fármaco pueda modular la excitabilidad celular.

La ACEA no produce cambios en la cinética de activación, pero en la cinética de inactivación le genera un enlentecimiento discreto pero significativo en el componente rápido, pero no en el componente lento.

La recuperación de la inactivación no se altera significativamente por la ACEA.

La ACEA muestra un bloqueo dependiente de uso, similar al observado en los anestésicos locales, por lo que el fármaco mostraría afinidad por el estado inactivado.

El tiempo de instalación del fármaco y su liposolubilidad apoyan la teoría de que el fármaco actúa atravesando la membrana plasmática.

La rápida inactivación del canal en las células CHO-K1, despierta el interés en indagar los factores que contribuyen en el cambio de la biofísica del mismo en relación a lo reportado en sistemas homólogos (células DRG).

## ANEXO A. Alineamiento del gen SCN11A con los fragmentos secuenciados.

El gen SCN11A que codifica para la subunidad alfa del canal hNav 1.9 consta de 6505 pares de bases (bp). El primer fragmento alineado abarca el rango de la 200 a 1022, mientras que el segundo va de la 4697 a la 5617. Ambos fragmentos se alinean correctamente. El alineamiento se obtuvo con el programa SnapGene 5.1.2 y BLAST ([blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov)).

### Homo sapiens sodium voltage-gated channel alpha subunit 11 (SCN11A).

Sequence ID: NM\_014139.3 Length: 6505 Number of Matches: 2

Range 1: 200 to 1022

Alignment statistics for match #1:

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1520 bits(823)	0.0()	823/823(100%)	0/823(0%)	Plus/Minus
Query 8	AGAGCTGCTGACCTACCAGGGCAAAGATGCTGAGGCAAAAGAAGGTGAGGATAATCACGT	67		
Sbjct 1022	AGAGCTGCTGACCTACCAGGGCAAAGATGCTGAGGCAAAAGAAGGTGAGGATAATCACGT	963		
Query 68	TGACCAGCTTCTTCACAGAGCGTAGCAAGGCCCCACGATGACCTTCAGACGTGAAACTA	127		
Sbjct 962	TGACCAGCTTCTTCACAGAGCGTAGCAAGGCCCCACGATGACCTTCAGACGTGAAACTA	903		
Query 128	CTGAAATTGCTTTCAAAGCTCTGAACACACGGAAGGTACGCAGGGCAATAGTTTGATGG	187		
Sbjct 902	CTGAAATTGCTTTCAAAGCTCTGAACACACGGAAGGTACGCAGGGCAATAGTTTGATGG	843		
Query 188	TGATTCTGGAATATATGACACAATCGCTATTCCAATGACAATGGAGTCCAGCCAGTTCC	247		
Sbjct 842	TGATTCTGGAATATATGACACAATCGCTATTCCAATGACAATGGAGTCCAGCCAGTTCC	783		
Query 248	ATGGATCTCGAAGGAAAGAAAACCATCCAGAATGAAACCTCTTGCCAATATTTAATCA	307		
Sbjct 782	ATGGATCTCGAAGGAAAGAAAACCATCCAGAATGAAACCTCTTGCCAATATTTAATCA	723		
Query 308	AAGCTTCAAAAATATAAATCCCAGTGAAGACACACTCTGCAATGTCAGTATTGTTACTGT	367		
Sbjct 722	AAGCTTCAAAAATATAAATCCCAGTGAAGACACACTCTGCAATGTCAGTATTGTTACTGT	663		
Query 368	TGCTGTTTTTAGCAGGCCCTGTAGCCATGAACACGCAGTTGATGATAACGGTGCCGATAA	427		
Sbjct 662	TGCTGTTTTTAGCAGGCCCTGTAGCCATGAACACGCAGTTGATGATAACGGTGCCGATAA	603		
Query 428	TGAACATGCTGAACAATGAATGGACTGAGACTCTAATGGCTAAACTTCTGATTGAATTGA	487		
Sbjct 602	TGAACATGCTGAACAATGAATGGACTGAGACTCTAATGGCTAAACTTCTGATTGAATTGA	543		
Query 488	AAGGCCCAAAAATGAACAAGGCATGCTTGGCACTGAAGCGGTAGATTGTCCTCTTTCTGT	547		
Sbjct 542	AAGGCCCAAAAATGAACAAGGCATGCTTGGCACTGAAGCGGTAGATTGTCCTCTTTCTGT	483		
Query 548	TTAACACCATAAATGTCTTATGATTTCCGGTAGAATGGGTCCAAGTCTTCCAGAGGCTTTC	607		

```

Sbjct 482      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| 423
                TTAACACCATAAAATGTCTTATGATTTCCGGTAGAATGGGTCCAAGTCTTCCAGAGGCTTTC
Query 608      CTATGAGCTCACGAGGAATGTGCCATAGAGCTTGGGCAACTTCTGGAGGCCTTTAGGT 667
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 422      CTATGAGCTCACGAGGAATGTGCCATAGAGCTTGGGCAACTTCTGGAGGCCTTTAGGT 363
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Query 668      CAAGCTGAGGCCGAGGCTGGGGTACTTCTCCTGTCTGGTCTTTAGACTTCTTTTCTCCT 727
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 362      CAAGCTGAGGCCGAGGCTGGGGTACTTCTCCTGTCTGGTCTTTAGACTTCTTTTCTCCT 303
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Query 728      TTTGGATGGCAATCCGCTTCTCAATTCAGCCAGAGAGTCCGGAAGTGAAGGGGCGGAAAT 787
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 302      TTTGGATGGCAATCCGCTTCTCAATTCAGCCAGAGAGTCCGGAAGTGAAGGGGCGGAAAT 243
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Query 788      TCCGCTCATCTGGAAAGATTACTGGGTAGCATCTGTCATCCAT 830
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 242      TCCGCTCATCTGGAAAGATTACTGGGTAGCATCTGTCATCCAT 200
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

```

**Homo sapiens sodium voltage-gated channel alpha subunit 11 (SCN11A).**

Sequence ID: NM\_014139.3 Length: 6505 Number of Matches: 2

Range 2: 4697 to 5617

Alignment statistics for match #2:

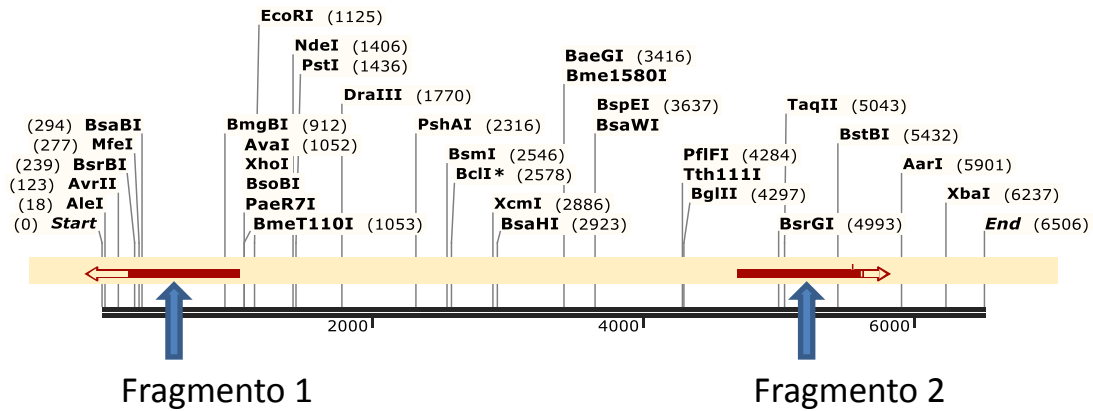
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1696 bits(918)	0.0()	921/922(99%)	1/922(0%)	Plus/Minus
Query 1	ATTGGTCTTCTACTCTTTCTGATTATGTTTATCTATGCCATTCTGGGTATGAACTGGTTTT			60
Sbjct 4697	ATTGGTCTTCTACTCTTTCTGATTATGTTTATCTATGCCATTCTGGGTATGAACTGGTTTT			4756
Query 61	TCCAAAGTGAATCCAGAGTCTGGAATCGATGACATATTCAACTTCAAGACTTTTGCCAGC			120
Sbjct 4757	TCCAAAGTGAATCCAGAGTCTGGAATCGATGACATATTCAACTTCAAGACTTTTGCCAGC			4816
Query 121	AGCATGCTCTGTCTCTTCCAGATAAGCACATCAGCAGGTTGGGATTCCTTGCTCAGCCCC			180
Sbjct 4817	AGCATGCTCTGTCTCTTCCAGATAAGCACATCAGCAGGTTGGGATTCCTTGCTCAGCCCC			4876
Query 181	ATGCTGCGATCAAAGAATCATGTAACCTTCTCCTCAGAAAAGTCCACCTCCCTGGCATA			240
Sbjct 4877	ATGCTGCGATCAAAGAATCATGTAACCTTCTCCTCAGAAAAGTCCACCTCCCTGGCATA			4936
Query 241	GCCACATCCTACTTTGTGAGTTACATTATCATCTCCTTTCTCATTTGTTGTCAACATGTAC			300
Sbjct 4937	GCCACATCCTACTTTGTGAGTTACATTATCATCTCCTTTCTCATTTGTTGTCAACATGTAC			4996
Query 301	ATTGCTGTGATTTTAGAGAAGTCAATACAGCCACTGAAGAAAGTGAGGACCCTTTGGGT			360
Sbjct 4997	ATTGCTGTGATTTTAGAGAAGTCAATACAGCCACTGAAGAAAGTGAGGACCCTTTGGGT			5056
Query 361	GAAGATGACTTTGACATATTTTATGAAGTGTGGGAAAAGTTTGACCCAGAAGCAACACAA			420
Sbjct 5057	GAAGATGACTTTGACATATTTTATGAAGTGTGGGAAAAGTTTGACCCAGAAGCAACACAA			5116
Query 421	TTTATCAAATATTCTGCCCTTTCTGACTTTGCTGATGCCTTGCCCTGAGCCTTTGCGTGTC			480
Sbjct 5117	TTTATCAAATATTCTGCCCTTTCTGACTTTGCTGATGCCTTGCCCTGAGCCTTTGCGTGTC			5176
Query 481	GCAAAGCCAAATAAATATCAATTTCTAGTAATGGACTTGCCCATGGTGAGTGAAGATCGC			540
Sbjct 5617	GCAAAGCCAAATAAATATCAATTTCTAGTAATGGACTTGCCCATGGTGAGTGAAGATCGC			5676

```

Sbjct  5177  GCAAAGCCAAATAAATATCAATTTCTAGTAATGGACTTGCCCATGGTGAGTGAAGATCGC  5236
Query   541  CTCCACTGCATGGATATTCTTTTCGCCTTCACCGCTAGGGTACTCGGTGGCTCTGATGGC  600
      |||
Sbjct  5237  CTCCACTGCATGGATATTCTTTTCGCCTTCACCGCTAGGGTACTCGGTGGCTCTGATGGC  5296
Query   601  CTAGATAGTATGAAAGCAATGATGGAAGAGAAGTTCATGGAAGCCAATCCTCTCAAGAAG  660
      |||
Sbjct  5297  CTAGATAGTATGAAAGCAATGATGGAAGAGAAGTTCATGGAAGCCAATCCTCTCAAGAAG  5356
Query   661  TTGTATGAACCCATAGTCACCACCACCAAGAGAAAGGAAGAGGAAAGAGGTGCTGCTATT  720
      |||
Sbjct  5357  TTGTATGAACCCATAGTCACCACCACCAAGAGAAAGGAAGAGGAAAGAGGTGCTGCTATT  5416
Query   721  ATTCAAAGGCCTTTCGAAAGTACATGATGAAGGTGACCAAGGGTGACCAAGGTGACCAA  780
      |||
Sbjct  5417  ATTCAAAGGCCTTTCGAAAGTACATGATGAAGGTGACCAAGGGTGACCAAGGTGACCAA  5476
Query   781  AATGACTTGGAACCGGCCTCATTCACTCCAGACTCTTTGCAATGGAGACTTGTCT  840
      |||
Sbjct  5477  AATGACTTGGAACCGGCCTCATTCACTCCAGACTCTTTGCAATGGAGACTTGTCT  5536
Query   841  AGCTTTGGGGTGGCCAAAGGGCAAGGTCCACTGTGACTGAGCCCTCACCTCCACGCCTAC  900
      |||
Sbjct  5537  AGCTTTGGGGTGGCC-AAGGGCAAGGTCCACTGTGACTGAGCCCTCACCTCCACGCCTAC  5595
Query   901  CTCATAGCTTACAGCCTTGCC  922
      |||
Sbjct  5596  CTCATAGCTTACAGCCTTGCC  5617

```

### Gen SCN11A



**SCN11A - Secuencia1 - Secuencia2**  
6506 bp

## BIBLIOGRAFÍA

- Beal, J. E., Olson, R., Laubenstein, L., Morales, J. O., Bellman, P., Yangco, B., Lefkowitz, L., Plasse, T. F., & Shepard, K. V. (1995). Dronabinol as a treatment for anorexia associated with weight loss in patients with AIDS. *Journal of Pain and Symptom Management*, 10(2), 89–97. [https://doi.org/10.1016/0885-3924\(94\)00117-4](https://doi.org/10.1016/0885-3924(94)00117-4)
- Ben Amar, M. (2006). Cannabinoids in medicine: A review of their therapeutic potential. *Journal of Ethnopharmacology*, 105(1–2), 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.02.001>
- Bosier, B., Muccioli, G. G., Hermans, E., & Lambert, D. M. (2010). Functionally selective cannabinoid receptor signalling: Therapeutic implications and opportunities. In *Biochemical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.02.013>
- Cadas, H., Gaillet, S., Beltramo, M., Venance, L., & Piomelli, D. (1996). Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.16-12-03934.1996>
- Calignano, A., Rana, G. La, Giuffrida, A., & Piomelli, D. (1998). Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature*, 394(6690), 277–281. <https://doi.org/10.1038/28393>
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., & Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/39807>
- Catterall, W. A. (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: The structure and function of voltage-gated sodium channels. In *Neuron*. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81133-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81133-2)
- Catterall, W. A. (2014). Structure and function of voltage-gated sodium channels at atomic resolution. *Experimental Physiology*, 99(1), 35–51. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2013.071969>
- Catterall, W. A., Goldin, A. L., & Waxman, S. G. (2005). International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. In *Pharmacological Reviews*. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.4>
- Chemin, J., Monteil, A., Perez-Reyes, E., Nargeot, J., & Lory, P. (2001). Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide. *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.24.7033>
- Childers, S. R., Pacheco, M. A., Bennett, B. A., Edwards, T. A., Hampson, R. E., Mu, J., & Deadwyler, S. A. (1993). Cannabinoid receptors: G-protein-mediated signal transduction mechanisms. In *Biochemical Society symposium*.
- Cota, D., Marsicano, G., Tschöp, M., Grübler, Y., Flachskamm, C., Schubert, M., Auer, D., Yassouridis, A., Thöne-Reineke, C., Ortman, S., Tomassoni, F., Cervino, C., Nisoli, E., Linthorst, A. C. E., Pasquali, R., Lutz, B., Stalla, G. K., & Pagotto, U. (2003). The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI17725>
- Cravatt, B. F., Giang, D. K., Mayfield, S. P., Boger, D. L., Lerner, R. A., & Gilula, N. B. (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/384083a0>
- De Lera Ruiz, M., & Kraus, R. L. (2015). Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function,

Pharmacology, and Clinical Indications. In *Journal of Medicinal Chemistry*.  
<https://doi.org/10.1021/jm501981g>

- Devane, W. A., Dysarz, F. A., Johnson, M. R., Melvin, L. S., & Howlett, A. C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular Pharmacology*.
- Devane, William A., Hanuš, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., & Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*.  
<https://doi.org/10.1126/science.1470919>
- Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J. C., & Piomelli, D. (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/372686a0>
- Dib-Hajj, S., Black, J. A., Cummins, T. R., & Waxman, S. G. (2002). Nav1.9: A sodium channel with unique properties. *Trends in Neurosciences*, 25(5), 253–259.  
[https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(02\)02150-1](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(02)02150-1)
- Eijkelkamp, N., Linley, J. E., Baker, M. D., Minett, M. S., Cregg, R., Werdehausen, R., Rugiero, F., & Wood, J. N. (2012). Neurological perspectives on voltage-gated sodium channels. *Brain*, 135(9), 2585–2612. <https://doi.org/10.1093/brain/aws225>
- Evans, F. J. (1997). *The Medicinal Chemistry of Cannabis: O' Shaughnessy's Legacy*. 533–537.
- Fine, P. G., & Rosenfeld, M. J. (2013a). The Endocannabinoid System, Cannabinoids, and Pain. *Rambam Maimonides Medical Journal*. <https://doi.org/10.5041/rmmj.10129>
- Fine, P. G., & Rosenfeld, M. J. (2013b). The Endocannabinoid System, Cannabinoids, and Pain. *Rambam Maimonides Medical Journal*, 4(4). <https://doi.org/10.5041/rmmj.10129>
- Foadi, N., Berger, C., Pilawski, I., Stoetzer, C., Karst, M., Haeseler, G., Wegner, F., Leffler, A., & Ahrens, J. (2014). Inhibition of voltage-gated na<sup>+</sup> channels by the synthetic cannabinoid ajulemic acid. *Anesthesia and Analgesia*, 118(6), 1238–1245.  
<https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000000188>
- Fraguas-Sánchez, A. I., Fernández-Carballido, A. M., & Torres-Suárez, A. I. (2014). Cannabinoides: Una prometedora herramienta para el desarrollo de nuevas terapias. *Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia*, 80(3), 555–577.
- Frenz, C. T., Hansen, A., Dupuis, N. D., Shultz, N., Levinson, S. R., Finger, T. E., & Dionne, V. E. (2014). Nav1.5 sodium channel window currents contribute to spontaneous firing in olfactory sensory neurons. *Journal of Neurophysiology*, 112(5), 1091–1104.  
<https://doi.org/10.1152/jn.00154.2014>
- Gelfand, E. V., & Cannon, C. P. (2006). Rimonabant: a selective blocker of the cannabinoid CB1 receptors for the management of obesity, smoking cessation and cardiometabolic risk factors. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 15(3), 307–315.  
<https://doi.org/10.1517/13543784.15.3.307>
- Glass, M., Dragunow, M., & Faull, R. L. M. (1997). Cannabinoid receptors in the human brain: A detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience*. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(96\)00428-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(96)00428-9)
- Goldin, A. L. (2001). Resurgence of Sodium Channel Research. *Annual Review of Physiology*.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.63.1.871>
- Goral, R. O., Leipold, E., Nematian-Ardestani, E., & Heinemann, S. H. (2015). Heterologous

- expression of NaV1.9 chimeras in various cell systems. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 467(12), 2423–2435. <https://doi.org/10.1007/s00424-015-1709-1>
- Grotenhermen, F. (2005). Cannabinoids. *Current Drug Target -CNS & Neurological Disorders*, 4(5), 507–530. <https://doi.org/10.2174/156800705774322111>
- Guzmán, M. (2003). Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nature Reviews Cancer*, 3(10), 745–755. <https://doi.org/10.1038/nrc1188>
- Heinemann, S. H., Terlau, H., Stuhmer, W., Imoto, K., & Numa, S. (1992). Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature*, 359, 710–713. <https://doi.org/10.1038/356441a0>
- Herkenham, M., Lynn, A. B., Johnson, M. R., Melvin, L. S., De Costa, B. R., & Rice, K. C. (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: A quantitative in vitro autoradiographic study. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.11-02-00563.1991>
- Herzog, R. I., Cummins, T. R., & Waxman, S. G. (2001). Persistent TTX-resistant Na<sup>+</sup> current affects resting potential and response to depolarization in simulated spinal sensory neurons. *Journal of Neurophysiology*. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.86.3.1351>
- Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A., Felder, C. C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B. R., Mechoulam, R., & Pertwee, R. G. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. In *Pharmacological Reviews*. <https://doi.org/10.1124/pr.54.2.161>
- Howlett, A. C., & Fleming, R. M. (1984). Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membrane. *Molecular Pharmacology*.
- Isom, L. L., De Jongh, K. S., Patton, D. E., Reber, B. F. X., Offord, J., Charbonneau, H., Walsh, K., Goldin, A. L., & Catterall, W. A. (1992). Primary structure and functional expression of the  $\beta$ 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1375395>
- Isom, Lori L. (2002). The role of sodium channels in cell adhesion. In *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. <https://doi.org/10.2741/isom>
- Jordt, S. E., Bautista, D. M., Chuang, H. H., McKemy, D. D., Zygmunt, P. M., Högestätt, E. D., Meng, I. D., & Julius, D. (2004). Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature02282>
- Kim, H. I., Kim, T. H., Shin, Y. K., Lee, C. S., Park, M., & Song, J. H. (2005). Anandamide suppression of Na<sup>+</sup> currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Research*, 1062(1–2), 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.09.004>
- Lambert, D. M., & Fowler, C. J. (2005). The endocannabinoid system: Drug targets, lead compounds, and potential therapeutic applications. In *Journal of Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jm058183t>
- Lee, H.-K., Choi, E., & Pak, C. (2009). The Current Status and Future Perspectives of Studies of Cannabinoid Receptor 1 Antagonists as Anti-Obesity Agents. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.2174/156802609788897844>
- Leffler, A., Herzog, R. I., Dib-Hajj, S. D., Waxman, S. G., & Cummins, T. R. (2005). Pharmacological properties of neuronal TTX-resistant sodium channels and the role of a critical serine pore residue. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*. <https://doi.org/10.1007/s00424-005-1463-x>

- Li, H. (2016). *An Archaeological and Historical Account of Cannabis in China* Author ( s ): Hui-Lin Li  
Published by : Springer on behalf of New York Botanical Garden Press Stable URL :  
<http://www.jstor.org/stable/4253540> Accessed : 15-07-2016 23 : 13 UTC *An Archaeologica*.  
28(4), 437–448.
- Mackie, K., Lai, Y., Westenbroek, R., & Mitchell, R. (1995). Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *Journal of Neuroscience*.  
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.15-10-06552.1995>
- Mackie, Ken. (2008). Signaling via CNS cannabinoid receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.01.022>
- Maingret, F., Patel, A. J., Lazdunski, M., & Honoré, E. (2001). The endocannabinoid anandamide is a direct and selective blocker of the background K<sup>+</sup> channel TASK-1. *EMBO Journal*.  
<https://doi.org/10.1093/emboj/20.1.47>
- Mechoulam, R., & Hanuš, L. (2000). A historical overview of chemical research on cannabinoids. In *Chemistry and Physics of Lipids*. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(00\)00184-5](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(00)00184-5)
- Mechoulam, R., Peters, M., Murillo-Rodriguez, E., & Hanuš, L. O. (2007). Cannabidiol - Recent advances. In *Chemistry and Biodiversity*. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200790147>
- Meisler, M. H., & Kearney, J. a. (2005). Date - 4th Nov . 08 Review series Presenter - Anand Sodium channel mutations in epilepsy and other neurological disorders Date - 4th Nov . 08 Presenter - Anand. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(8), 2010–2017.  
<https://doi.org/10.1172/JCI25466.2010>
- Mendiguren, A., & Pineda, J. (2004). Cannabinoids enhance N-methyl-D-aspartate-induced excitation of locus coeruleus neurons by CB1 receptors in rat brain slices. *Neuroscience Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.02.073>
- Munro, S., Thomas, K. L., & Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/365061a0>
- Okura, D., Horishita, T., Ueno, S., Yanagihara, N., Sudo, Y., Uezono, Y., & Sata, T. (2014). The endocannabinoid anandamide inhibits voltage-gated sodium channels Nav1.2, Nav1.6, Nav1.7, and Nav1.8 in xenopus oocytes. *Anesthesia and Analgesia*.  
<https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000000070>
- Osei-Hyiaman, D., DePetrillo, M., Pacher, P., Liu, J., Radaeva, S., Bátkai, S., Harvey-White, J., Mackie, K., Offertáler, L., Wang, L., & Kunos, G. (2005). Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI200523057>
- Östman, J. A. R., Nassar, M. A., Wood, J. N., & Baker, M. D. (2008). GTP up-regulated persistent Na<sup>+</sup> current and enhanced nociceptor excitability require Nav1.9. *Journal of Physiology*, 586(4), 1077–1087. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.147942>
- Pacher, P., Bátkai, S., & Kunos, G. (2006). The Endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy. *Pharmacological Reviews*, 58(3), 389–462.  
<https://doi.org/10.1124/pr.58.3.2>
- Palmer, S. L., Thakur, G. A., & Makriyannis, A. (2002). Cannabinergic ligands. *Chemistry and Physics of Lipids*. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(02\)00143-3](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(02)00143-3)
- Pazos, M. R., Tolón, R. M., Benito, C., Rodríguez, C. F., Gorgojo, J. J., Nevado, M., Álvarez, M., Arias, F., Almodóvar, F., Fernández, M. T. P., Lledó, J. L., González, S., Fernández-Ruiz, J.

- J., & Romero, J. (2008). Cannabinoid CB1 receptors are expressed by parietal cells of the human gastric mucosa. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. <https://doi.org/10.1369/jhc.2008.950741>
- Pertwee, R G. (1999). Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Current Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1002/chin.199945328>
- Pertwee, Roger G. (2008). Ligands that target cannabinoid receptors in the brain: From THC to anandamide and beyond. In *Addiction Biology*. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2008.00108.x>
- Poling, J. S., Rogawski, M. A., Salem, N., & Vicini, S. (1996). Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits Shaker-related voltage-gated K<sup>+</sup> channels. *Neuropharmacology*. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(96\)00130-X](https://doi.org/10.1016/0028-3908(96)00130-X)
- Ross, R. A. (2003). Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. In *British Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705467>
- Ryberg, E., Larsson, N., Sjögren, S., Hjorth, S., Hermansson, N. O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T., & Greasley, P. J. (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *British Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707460>
- Sánchez, M. G., Sánchez, A. M., Collado, B., Malagarie-Cazenave, S., Olea, N., Carmena, M. J., Prieto, J. C., & Díaz-Laviada, I. (2005). Expression of the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) in LNCaP and PC-3 prostate cancer cells and in human prostate tissue. *European Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.04.010>
- Stella, N., Schweitzer, P., & Plomelli, D. (1997). A second endogenous' cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/42015>
- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., ... S. N.-B. and, & 1995, U. (1995). 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Elsevier*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X85724370>
- Tsou, K., Brown, S., Sañudo-Peña, M. C., Mackie, K., & Walker, J. M. (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00436-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00436-3)
- Yang, N., & Horn, R. (1995). Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels. *Neuron*. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90078-0](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90078-0)
- Zygmunt, P. M., Petersson, J., Andersson, D. A., Chuang, H. H., Sjørgård, M., Di Marzo, V., Julius, D., & Högestätt, E. D. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/22761>