

**Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**

**Posgrado en Ciencias Químicas**

**Facultad de Ciencias Químicas**

**Instituto de Fisiología**

**Tesis doctoral:**

**“Estudio de la interacción molecular de la mefloquina con el canal de sodio dependiente del voltaje (Na<sub>v</sub>1.4)”**

**Presentada para obtener el grado de:**

**Doctor en Ciencias Químicas**

**Área de Bioquímica y Biología Molecular**

**Presenta:**

**M. en C. Bertin Paiz Candia**

**Directores de tesis:**

**Tutor (Director interno): Dr. Thomas R. F. Scior**

Laboratorio de Simulaciones Moleculares Computacionales,  
Depto. de Farmacia FCQ-BUAP

**Asesor (Director externo): Dr. Eduardo M. Salinas Stefanón**

Laboratorio de Biofísica Cardíaca, Instituto de Fisiología, BUAP



**Puebla, 26 de Junio de 2017**



## Agradecimientos

Este trabajo fue financiado económicamente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado mediante la beca 237103 (2013-2016) y por la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) por fondos del proyecto VIEP-BUAP SCJT-NAT-14-6 asignados al Cuerpo Académico de Farmacobiología de la BUAP.

Agradezco también el apoyo del Dr. Alfredo Sánchez Solano y la Dra. Lourdes Millán Pérez Peña por la realización de las mutaciones que se utilizaron en este proyecto y que fueron desarrolladas en el Laboratorio de Bioquímica Y Biología Molecular del ICUAP. Así mismo extendiendo este agradecimiento al Laboratorio Nacional de Supercomputo (LNS) del Sureste de México por permitir la utilización de su infraestructura para la realización de parte de los análisis *in silico*.

A mis directores de tesis, el Dr. Thomas R. F. Scior responsable del Laboratorio de Simulaciones Computacionales donde se realizaron los estudios *in silico*; y al Dr. Eduardo M. Salinas Stefanón responsable del Laboratorio de Biofísica Cardíaca en donde se desarrollaron los estudios electrofisiológicos. Les agradezco por haberme brindado la oportunidad de participar en este proyecto. En lo personal valoro sus estimables consejos, conocimientos y experiencia, los cuales me ayudaron a completar este periodo de mi formación como científico y me serán útiles para el futuro.

A los miembros del Laboratorio de Biofísica Cardíaca con los que he compartido momentos increíbles. Especialmente tienen mi gratitud Alfredo Sánchez y Ángel Islas ya que sin su apoyo y conocimientos esta tesis no podría haberse realizado. También agradezco a Jorge Lozano y a Claudia Mancilla por sus geniales e invaluable consejos personales.

A mi comité tutorial, Dra. Irma Herrera, Dra. Lourdes Millan, Dr. Eduardo Brambila, Dr. Emilio Salseda y Dr Julian Yunes, por su esmero e interés para la revisión de esta tesis.

***“Esta tesis va sin cita, no sé, me  
pareció cómico”***

***Dedicado a mis padres, mis hermanos y mis amigos.  
Por ser el ímpetu de mis acciones.***

## ÍNDICE

ÍNDICE .....	v
LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE TABLAS .....	ix
ABREVIATURAS .....	x
ABSTRACT .....	0
RESUMEN .....	2
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Generalidades .....	1
1.2. Canales de sodio voltaje-dependientes .....	2
1.2.1. Estructura de los canales de sodio voltaje-dependientes .....	3
1.2.2. Relación estructura-función de los canales de sodio voltaje-dependientes .....	5
1.3. Cinética de los canales de sodio voltaje-dependientes .....	6
1.3.1. Activación .....	7
1.3.2. Inactivación rápida .....	7
1.3.3. Inactivación Lenta .....	8
1.4. Moduladores del canales de sodio voltaje-dependientes .....	8
1.4.1. Toxinas .....	10
1.4.2. Anestésicos locales .....	10
1.4.3. Antiarrítmicos .....	11
1.5. Antimaláricos de tipo aminoquinolinas .....	11
1.6. Mefloquina .....	12
1.7. Estudios de aminoquinolinas en canales iónicos .....	15
2. JUSTIFICACIÓN .....	16
3. HIPÓTESIS .....	18
4. OBJETIVO GENERAL .....	18
5. OBJETIVOS PARTICULARES .....	18
6. ESQUEMA DE TRABAJO .....	19
7. METODOLOGÍA .....	20
7.1. Mutagénesis sitio dirigida específica .....	20
7.2. Técnica de expresión de canales iónicos en ovocitos de rana .....	20
7.3. Registros electrofisiológicos .....	21
7.4. Protocolos experimentales y análisis de datos .....	22
7.5. Análisis de datos y pruebas estadísticas .....	24
7.6. Experimentos <i>in silico</i> .....	25
7.6.1. Modelado de las proteínas y fármacos .....	26
7.6.2. Estudio de acoplamiento molecular ( <i>docking</i> ) .....	27
7.6.3. Dinámica molecular .....	27
8. RESULTADOS .....	29

8.1.	Efecto de mefloquina sobre las corrientes de sodio de canales $Na_v1.4$ sin la subunidad $\beta1$ .....	30
8.1.1.	Concentración inhibitoria media de canales $Na_v1.4$ sin la subunidad $\beta1$ .....	31
8.1.2.	Curso temporal del efecto de mefloquina sobre la corriente de sodio de canales $Na_v1.4$ sin la subunidad $\beta1$ 32	
8.1.3.	Relación corriente contra voltaje de canales $Na_v1.4$ sin la subunidad $\beta1$ .....	33
8.1.4.	Inactivación de estado estable y activación de canales $Na_v1.4$ sin la subunidad $\beta1$ .....	34
8.1.5.	Estudio del curso temporal de la recuperación de la inactivación y la dependencia de uso en canales $Na_v1.4$ sin subunidad $\beta1$ .....	35
8.2.	Efecto de mefloquina en canales coexpresados con la subunidad $\beta1$ .....	38
8.2.1.	Concentración inhibitoria media de canales $Na_v1.4$ coexpresados con la subunidad $\beta1$ .....	39
8.2.2.	Relación corriente contra voltaje de canales $Na_v1.4$ expresados con la subunidad $\beta1$ .....	40
8.2.3.	Inactivación de estado estable y activación de canales $Na_v1.4$ coexpresados con la subunidad $\beta1$ .....	41
8.2.4.	Estudio del curso temporal de la recuperación de la inactivación y dependencia del uso de canales $Na_v1.4$ coexpresados con la subunidad $\beta1$ .....	43
8.3.	Estudios del efecto de mefloquina en mutantes $Na_v1.4$ sin subunidad $\beta1$ .....	45
8.3.1.	Mutación de triptófano a cisteína (W756C).....	45
8.3.2.	Mutación de tirosina por cisteína (Y401C) .....	46
8.3.3.	Mutaciones de la lisina del motivo DEKA por alanina (K1237A) y por cisteína (K1237C) .....	47
8.3.4.	Efecto de mefloquina en el sitio de unión a anestésicos locales F1579.....	50
8.4.	Análisis <i>in silico</i> de la interacción entre mefloquina y los canales $Na_v1.4$ .....	53
8.4.1.	Generación del modelo del canal $Na_v1.4$ mediante modelaje por homología .....	53
8.4.2.	Construcción y refinamiento del ligando mefloquina .....	58
8.4.3.	Sitios de interacción <i>in silico</i> entre MQ y los canales $Na_v1.4$ .....	60
8.4.4.	Estudios de la interacción de MQ a los canales $Na_v1.4$ por medio de dinámica molecular.....	62
8.5.	Modelado <i>in silico</i> de la subunidad $\beta1$ .....	65
9.	DISCUSIÓN .....	68
10.	CONCLUSIONES .....	71
11.	PERSPECTIVAS .....	72
12.	REFERENCIAS.....	73
13.	PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS .....	81
13.1.	Artículos arbitrados e indexados .....	81
13.2.	Comunicaciones en congresos internacionales .....	81
13.3.	Comunicaciones en congresos nacionales.....	81
14.	APÉNDICE A. Condiciones para la mutagénesis sitio dirigida .....	i
14.1.	Mutagénesis sitio dirigida específica .....	i
14.2.	Diseño de los oligonucleótidos con las respectivas mutaciones .....	i
14.3.	Mutagénesis sitio dirigida.....	i
14.4.	Obtención de ADN Plásmido por ebullición (mini prep).....	iii
14.5.	Propagación de los plásmidos mutados .....	iii
14.6.	Extracción del ADN plasmídico .....	iii

14.7. Verificación de las mutaciones .....	iv
15. APÉNDICE B. Mecánica Molecular .....	v
16. APÉNDICE C. Datos del estudio de la interacción de las subunidades $\alpha$ y $\beta$ de los canales Nav1.4 .....	vii
16.1. Búsqueda y evaluación de las estructuras cristalográficas para predecir el sitio de interacción .....	vii
16.2. Estudios topológicos para evaluar las características estructurales entre las plantillas tridimensionales.....	ix

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la topología del canal de Na <sup>+</sup> voltaje dependiente (Nav).	4
Figura 2. Poro iónico de la subunidad $\alpha$ de los canales Nav.	6
Figura 3. Estructura química de la mefloquina.	13
Figura 4. Esquemas de los protocolos de estimulación.	25
Figura 5. Efecto inhibitorio de mefloquina sobre la I <sub>Na+</sub> .	30
Figura 6. Efecto de diferentes concentraciones de MQ sobre la I <sub>Na+</sub> .	31
Figura 7. Curva concentración-efecto de MQ sobre los canales Nav1.4.	31
Figura 8. Curso temporal del efecto de MQ sobre la corriente de los canales Nav 1.4.	33
Figura 9. Relación corriente contra voltaje de las subunidades $\alpha$ de canales Nav1.4 sin subunidad $\beta$ 1 expresadas en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> .	34
Figura 10. Inactivación de estado estable y activación en canales Nav1.4 sin subunidad $\beta$ 1.	35
Figura 11. Efecto de mefloquina sobre la recuperación de la inactivación en canales Nav1.4 sin subunidad $\beta$ 1.	36
Figura 12. Efecto de mefloquina sobre la dependencia de uso y frecuencia en canales Nav1.4 sin subunidad $\beta$ 1.	37
Figura 13. Efecto de diferentes concentraciones de MQ sobre la I <sub>Na+</sub> en canales Nav1.4 coexpresados con la subunidad $\beta$ 1.	39
Figura 14. Efecto de mefloquina en presencia y ausencia de la subunidad $\beta$ 1 sobre las I <sub>Na+</sub> de Nav1.4.	40
Figura 15. Relación corriente contra voltaje de los canales Nav1.4 coexpresados con la subunidad $\beta$ 1 en ovocitos de <i>X. laevis</i> .	41
Figura 16. Inactivación de estado estable y activación en canales Nav1.4 coexpresados con la subunidad $\beta$ 1	42
Figura 17. Efecto de mefloquina sobre la recuperación de la inactivación en canales Nav1.4 coexpresados con la subunidad $\beta$ 1.	43
Figura 18. Efecto de mefloquina sobre la dependencia de uso y frecuencia en canales Nav1.4 coexpresado con la subunidad $\beta$ 1.	44
Figura 19. Efecto de MQ sobre la corriente en canales mutados W756C.	46
Figura 20. Efecto de MQ sobre la corriente en canales mutados Y401C.	47
Figura 21. Efecto de MQ sobre la corriente en canales mutados K1237C y K1237A.	49
Figura 22. Efecto de MQ sobre la I <sub>Na+</sub> en canales mutados F1579A.	50
Figura 23. Efecto de bloqueo de MQ sobre la I <sub>Na+</sub> y concentración efecto de canales estudiados.	51
Figura 24. Estructura cristalográfica de la subunidad $\alpha$ del canal Nav de <i>Arcobacter butzleri</i> .	55
Figura 25. Estructura secundaria predicha del canal Nav1.4.	56
Figura 26. Regiones modeladas del canal Nav1.4.	57
Figura 27. Modelo por homología del canal Nav1.4 de rata.	58
Figura 28. Probables sitios de interacción entre Nav1.4 y mefloquina.	60
Figura 29. Análisis del sitio de unión relacionado con la boca externa del canal.	61
Figura 30. Sitio de interacción de mefloquina en el LABS del interior del canal Nav1.4.	62
Figura 31. Fluctuación de F1579 del LABS del canal Nav1.4 y resultados de acoplamiento de la mefloquina con F1579 obtenidos por dinámica molecular.	63
Figura 32. Resultados de acoplamiento de ajuste inducido de mefloquina después de 80 ns de simulaciones DM del canal Nav1.4.	64
Figura 33. Estudio de la estructura primaria, secundaria y topología de la subunidad $\beta$ 1 de los canales Nav1.4.	65
Figura 34. Interacción entre las subunidades $\alpha$ y $\beta$ de los canales Nav1.4.	66

Figura 35. Efecto de la mutación de la subunidad $\beta$ en la cinética de los canales $\text{Na}_v1.4$ .	67
Figure C.1. Diagrama topológico de la proteína mielina P0 (PDB ID: 1NEU_A). Se pueden observar la secuencia y la topología de la estructura cristalográfica de la proteína mielina P0 de rata (Shapiro et al., 1996). Código:	x
Figure C.2. Diagrama topológico la fracción fab d3h44 humanizada (PDB ID: 1JPS_H). Se pueden observar la secuencia y la topología de la estructura cristalográfica de la fracción fab d3h44 humanizada de humano (Faelber et al., 2001). Código:	xi
Figure C.3. Diagrama topológico del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (PDB ID: 3GRW_A). Se pueden observar la secuencia y la topología de la estructura cristalográfica del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos de humano (Qing et al., 2009). Código:	xii
Figure C.4. Diagrama topológico de la contactina 4 (PDB ID: 3KDL_A). Se pueden observar la secuencia y la topología de la estructura cristalográfica de la contactina 4 de ratón (Bouyain y Watkins, 2010). Código:	xiii
Figure C.5. Diagrama topológico del receptor factor de crecimiento BDNF/NT-3 (PDB ID: 1HCF_X). Se pueden observar la secuencia y la topología del receptor al factor de crecimiento BDNF de humano (Ultsch et al., 1999). Código:	xiv
Figure C.6. Diagrama topológico final de la subunidad $\beta 1$ después de alinear manualmente la secuencia a través de la estructura tridimensional de los moldes. Se pueden observar las posiciones finales de los residuos en la subunidad $\beta 1$ respetando (conservando lo más posible) la información de la estructura secundaria. Código:	xv

#### LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Estudio de la localización y expresión de genes de canales $\text{Na}_v$ en humanos y roedores.	3
Tabla 2. Sitios de unión a neurotóxicas en los canales de $\text{Na}^+$ .	9
Tabla 3. Antecedentes del estudio de la interacción de los antimaláricos con los canales iónicos.	15
Tabla 4. Estudio de homología de los modelos cristalográficos de canales $\text{Na}_v$ Bacterianos.	54
Tabla 5. Características farmacológicas y fisicoquímicas de las aminoquinolinas CIQ, PQ y MQ.	59
Tabla A.1. Condiciones de la mezcla de mutagénesis.	ii
Tabla A.2. Condiciones del termociclador.	ii
Tabla C.1. Lista de plantillas con interfaces análogas a la interacción entre las subunidades $\alpha$ y $\beta$ de los canales $\text{Nav}1.4$ .	viii

## ABREVIATURAS

<b>μM</b>	Micromolar
<b>aa</b>	Aminoácido(s)
<b>ADN</b>	Acido desoxirribonucleico
<b>AL</b>	Anestésico(s) local(es)
<b>Aprox.</b>	Aproximadamente
<b>BTX</b>	Batracotoxina
<b>Ca<sup>+</sup></b>	Ión(es) Calcio
<b>CIQ</b>	Cloroquina
<b>DEKA</b>	Anillo conformado por I-Asp (D), II-Glu (E), III-Lys (K) y IV-Ala (A), filtro de selectividad
<b>DM</b>	Dinámica molecular
<b>EEDD</b>	Anillo más externo formado por Asp (D y Glu (E) cargados negativamente
<b>E<sub>m</sub></b>	Potencial de membrana
<b>ERO</b>	Especie(s) reactiva(s) de oxígeno
<b>ESM</b>	Error estándar de la media
<b>IC<sub>50</sub></b>	concentración inhibitoria media ( <i>half maximal inhibitory concentration</i> )
<b>I<sub>to</sub></b>	Corriente transitoria de salida de potasio
<b>K<sup>+</sup></b>	Ión(es) Potasio
<b>LABS</b>	Sitio de unión a analgésicos locales ( <i>Local anesthetics Binding Site</i> )
<b>MQ</b>	Mefloquina
<b>ms</b>	milisegundos
<b>mV</b>	Milivolts
<b>Na<sup>+</sup></b>	Ión(es) Sodio
<b>Na<sub>v</sub></b>	Canal(es) de sodio voltaje-dependient(es)
<b>pb</b>	Par(es) de base(s)
<b>PQ</b>	Primaquina
<b>QN</b>	Quinidina
<b>RMSD</b>	Desviación cuadrática media ( <i>Root Mean Square Deviation</i> )
<b>STX</b>	Saxitoxina
<b>T<sub>m</sub></b>	temperatura de fusión ( <i>Melting temperature</i> )
<b>TTX</b>	Tetrodotoxina
<b>VSD</b>	Dominio sensor de voltaje

## ABSTRACT

The treatment with antimalarial drugs chloroquine (CQ), primaquine (PQ) and mefloquine (MQ) have been correlated with secondary clinical effects at high or repeated doses. These effects include the depression of cardiovascular function, deficiency of myocardial contractility and cardiac arrhythmias. It has been suggested that this type of drugs could regulate the action of ion channels probably by the reversible junction to the open channels. However, its mechanism of action still unknown. This work uses MQ as a pharmacological tool to investigate the site of interaction of aminoquinolines in the  $\text{Na}_v1.4$  channels of skeletal muscle. To do this we used a heterologous expression in *Xenopus laevis* oocytes, electrophysiological records by voltage fixation with double micro-electrode and in silico analysis.

The electrophysiological studies show that in  $\text{Na}_v1.4$  channels expressed without the accessory  $\beta 1$  subunit, MQ has a drug concentration-dependent inhibition of sodium current ( $I_{\text{Na}^+}$ ) with an  $\text{IC}_{50} = 66 \mu\text{M}$ . It was also observed that MQ shifts the inactivation potential to hyperpolarizing potentials and similarly slightly affects conductance without the effects are becoming significant. Time course studies showed that MQ is very closely attached to its receptor site, and such affinity causes recovery of the blocking to be very slow. On the other hand MQ does not affect the fraction of channels recovered after inactivation nor the recovery time of the channels and does not seem to have a blocking effect dependent Neither the use nor the frequency.

The results demonstrate that MQ activity is modified by co-expression of the  $\beta 1$  subunit. Although MQ still reduced the  $I_{\text{Na}^+}$  in a form concentration-dependent, the affinity for the channel is lower, showing an  $\text{IC}_{50} = 128.13 \mu\text{M}$ . In this conditions, we observe a slight change of activation and inactivation potentials towards more depolarizing potentials, a result contrary to that seen on  $\text{Na}_v1.4$  channels without the  $\beta 1$  subunit. In addition, MQ seems to interfere with the activity of the  $\beta 1$  subunit since a reduction in the channels recovery was observed in both its slow and fast component in a significant way and shows a use-dependent blockade, but not the frequency.

The results demonstrate that MQ activity is modified by co-expression of the  $\beta 1$  subunit. Although MQ still reduced the  $I_{\text{Na}^+}$  in a form concentration-dependent, the affinity for the channel is lower, showing an  $\text{IC}_{50} = 128 \mu\text{M}$ . In this conditions, we observe a slight change of activation and inactivation potentials towards more depolarizing potentials, a result contrary to that seen on  $\text{Na}_v1.4$  channels without the  $\beta 1$  subunit. In addition, MQ seems to interfere with the activity of the  $\beta 1$  subunit,

since a reduction in the channels recovery was observed in both its slow and fast component in a significant way and shows a use-dependent block, but is unaffected for the frequency.

Using site-directed mutagenesis of residues located in the outer mouth of the channel, it was determined that MQ did not have the same site of interaction as PQ since the W756C mutation did not reduce the affinity of the drug or the effects. When we probe the Y401 residue which was suggested in docking study analysis also did not find a reduction of the effects in the channels. However, the K1237C mutation showed an interesting effect by increasing the potency of the MQ effect but not the K1237A mutation. When testing the F1579A mutation of the local anesthetic binding site (LABS) a reduction of inhibition of  $I_{Na+}$  was observed in a significant way which allowed to establish that MQ binds to this site of interaction.

Computational analyzes allow us to suggest that MQ interacts through a  $\pi$ - $\pi$  bond between its quinoline ring and the aryl group of F1579 in a hydrophobic cavity where I1575 also participates and that the positive charge of the piperidyl group is oriented toward the lysine of DEKA ring in the pore lumen.

## RESUMEN

El uso de los fármacos antimaláricos la cloroquina (CQ), la primaquina (PQ) y la mefloquina (MQ) se ha correlacionado con efectos clínicos secundarios a dosis altas o repetidas. Esos efectos incluyen la depresión de la función cardiovascular, la deficiencia de la contractilidad del miocardio y arritmias cardiacas. Se ha sugerido, que este tipo de fármacos podrían regular la acción de canales iónicos probablemente por la unión reversible a los canales en estado abierto. Sin embargo su mecanismo de acción aún no es claro. Este trabajo utiliza a la MQ como herramienta farmacológica para investigar el sitio de interacción de las aminoquinolinas en los canales  $Na_v1.4$  del músculo esquelético. Para ello utilizamos expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis*, registros electrofisiológicos por fijación de voltaje con doble micro-electrodo y análisis *in silico*.

La evidencia electrofisiológica demuestra que en canales  $Na_v1.4$  expresados sin la subunidad  $\beta 1$  accesoria, MQ tiene un efecto inhibitor de la corriente de sodio ( $I_{Na+}$ ) dependiente de la concentración del fármaco con una  $IC_{50} = 66.8 \mu M$ . También se observó que MQ desplaza el potencial de inactivación hacia potenciales hiperpolarizantes y del mismo modo afecta ligeramente la conductancia sin llegar a ser significativo. Los estudios del curso temporal mostraron que MQ es muy afín a su sitio receptor, y dicha afinidad ocasiona que la recuperación del efecto de bloqueo sea muy lenta. Por otro lado MQ no afecta la fracción de canales recuperados después de la inactivación ni tampoco el tiempo de recuperación de los canales y parece no tener un efecto de bloqueo dependiente del uso ni la frecuencia.

Los resultados también demuestran que la actividad de MQ se modifica por la coexpresión de la subunidad  $\beta 1$ . A pesar de que sigue presentando una inhibición de la  $I_{Na+}$  dependiente de la concentración, la afinidad por el canal disminuye mostrando una  $IC_{50} = 128.13 \mu M$ . En estas condiciones existe un ligero cambio de potenciales de activación e inactivación hacia potenciales más despolarizantes, resultado contrario al visto en canales  $Na_v1.4$  sin la subunidad  $\beta 1$ . Además, MQ parece interferir en la actividad de la subunidad  $\beta 1$  ya que se observó una reducción en el tiempo de recuperación de los canales tanto en su componente lenta como en la rápida de manera significativa y muestra un bloqueo dependiente del uso, pero no así de la frecuencia.

Usando mutagénesis de sitio dirigida de los residuos localizados en la boca externa del canal se determinó que MQ no tenía el mismo sitio de interacción que PQ ya que la mutación W756C no redujo la afinidad del fármaco ni sus efectos. Al probar otro sitio sugerido por los análisis de acoplamiento molecular (*docking*) Y401 tampoco mostro una reducción del efecto. Sin embargo, la mutación K1237C

mostró un efecto interesante al incrementar la potencia del efecto de MQ pero no así la mutación K1237A. Al probar la mutación de F1579A del sitio de unión a anestésicos locales (LABS) se observó una reducción de la inhibición de la  $I_{Na^+}$  de manera significativa lo que permitió establecer que MQ se une a este sitio de interacción.

Los análisis computacionales nos permiten sugerir que MQ interacciona a través de una unión  $\pi$ - $\pi$  entre su anillo de quinolina y el grupo arilo de F1579 en una cavidad hidrófoba donde también participa I1575 y que la carga positiva del grupo piperidil se orienta hacia la lisina del anillo DEKA en el lumen del poro.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Generalidades

En las células, la membrana plasmática es una estructura integrada por una doble capa de fosfolípidos que limita el interior celular y el ambiente extracelular. La principal característica de esta estructura es la permeabilidad altamente selectiva a diferentes compuestos entre los que se encuentran los iones inorgánicos. Cierta número de proteínas permiten el flujo de estos iones entre el citoplasma y el ambiente extracelular, estas proteínas son conocidas como canales iónicos (Hille, 1992; Katz, 1994).

Estos canales son poros acuosos constituidos básicamente por: un filtro de selectividad, un sensor de voltaje, un vestíbulo externo, un vestíbulo interno, y en algunos casos, una partícula de inactivación (p. ej. el canal de sodio). Estos canales han sido divididos en función del tipo de estímulo que permite la apertura del canal como: a) canales activados por voltaje, b) canales activados por ligando y c) canales que son activados por estímulos fisicoquímicos (p. ej. pH, volumen, tensión, etc.). Existen de igual modo un grupo de canales que no requieren de un estímulo definido para su apertura los cuales son conocidos como canales de fondo “*Background*” (Carmeliet y Mubagwa, 1998; Ertel *et al.*, 2000; Catterall *et al.*, 2005; Gutman *et al.*, 2005).

La apertura ordenada de los canales iónicos permite el desarrollo de la excitabilidad de las membranas celulares en tejidos musculares, tejidos nerviosos y tejidos glandulares. En el caso del potencial de acción, la primera fase depende de un canal selectivo al ion Na<sup>+</sup> que se encuentra presente en la membrana de las células eléctricamente excitables (Armstrong y Hille, 1998, Catterall, 2012). Estos canales conocidos como canales de Na<sup>+</sup> voltaje-dependientes (Na<sub>v</sub>) fueron estudiados inicialmente por Hodgkin y Huxley a principios de los 50's dando evidencia del tipo de permeabilidad catiónica (flujo de iones a través de la membrana) y del mecanismo de compuerta “*gating*” (cambios conformacionales dinámicos en respuesta a la fluctuación del potencial de membrana (E<sub>m</sub>)) (Hodgkin y Huxley, 1952; Balser, 2001). Los estudios de las propiedades de conducción, dependencia de voltaje, rectificación, selectividad iónica, activación, inactivación y la farmacología de los compuestos químicos que afectan la cinética de los canales Na<sub>v</sub>, son apoyados de la técnica de fijación por voltaje<sup>1</sup> (Marban *et al.*, 1998).

---

<sup>1</sup> Se conoce como fijación de voltaje a la variante de la técnica de *patch clamp* que implica fijar y mantener de forma constante el potencial de membrana en una célula en registro. De este modo el experimentador puede diseñar protocolos para establecer los distintos valores de potencial a los que quiere poner su membrana, y así estudiar la cinética y comportamiento de los canales iónicos y sus corrientes asociadas en todo el rango de potenciales de una célula

Derivados de estos estudios se conoce que cambios conformacionales en la estructura controlan los procesos de compuerta y permeabilidad del canal, también se ha estudiado que ciertos fármacos modifican el comportamiento de los cambios conformacionales y así también el funcionamiento del mismo (Balsler, 2001). La relación entre la disfunción de los canales de Na<sup>+</sup> y un gran número de enfermedades que incluyen las arritmias cardíacas, epilepsia, dolor neuropático e inflamatorio, parálisis periódica, migraña, esclerosis múltiple, la enfermedad de Huntington y el cáncer, han hecho que los canales Na<sub>v</sub> sean blanco de gran número de estudios para establecer su estructura y función (Clare *et al.*, 2000; Dib-Hajj *et al.*, 2010; Mantegazza *et al.*, 2010).

## 1.2. Canales de sodio voltaje-dependientes

Los canales de Na<sup>+</sup> voltaje-dependientes (Na<sub>v</sub>), son parte de una superfamilia de canales que movilizan iones Na<sup>+</sup> en respuesta a cambios ligeros del E<sub>m</sub>. Estos canales son complejos formados por una subunidad α principal que puede estar asociada a una o dos subunidades β<sub>1</sub> y β<sub>2</sub>. La subunidad α posee la capacidad de movilizar iones hacia el interior de la célula y es la que determina el tipo de isoforma del canal. Hasta el momento, se han identificado y caracterizado funcionalmente 9 diferentes subunidades α nombrándolas de Na<sub>v</sub>1.1 a Na<sub>v</sub>1.9. Además existe una décima subunidad α (Na<sub>x</sub>) que no ha sido caracterizada completamente. Todas las isoformas conservan más del 50 % de identidad en la secuencia de aminoácidos de los dominios transmembranales (Goldin, 1999; Yu y Catterall, 2003; Catterall *et al.*, 2005).

Como se observa en la Tabla 1, filogenéticamente los canales Na<sub>v</sub> en mamíferos forman una única familia de canales dividida en cuatro subgrupos en donde los genes de los canales son codificados en diferentes cromosomas y tejidos, además muestran diferente sensibilidad a la toxina tetrodotoxina (TTX), esta sensibilidad es originada por un sitio de interacción localizado en labio extracelular del canal donde una tirosina es vital para la unión. Es a través de esta interacción que ha sido posible determinar la secuencia y estructura de los canales Na<sub>v</sub> (Catterall *et al.*, 2005). Las isoformas Na<sub>x</sub> (codificadas en el cromosoma 2) no han podido expresarse funcionalmente, una posibilidad es que estos genes no codifiquen para canales de Na<sup>+</sup> activados por voltaje, sin embargo, se han localizado en tejido cardíaco, uterino, músculo esquelético, astrocitos y ganglios de la raíz dorsal (Goldin *et al.*, 2000; Goldin, 2001; 2002).

**Tabla 1.** Estudio de la localización y expresión de genes de canales Na<sub>v</sub> en humanos y roedores.

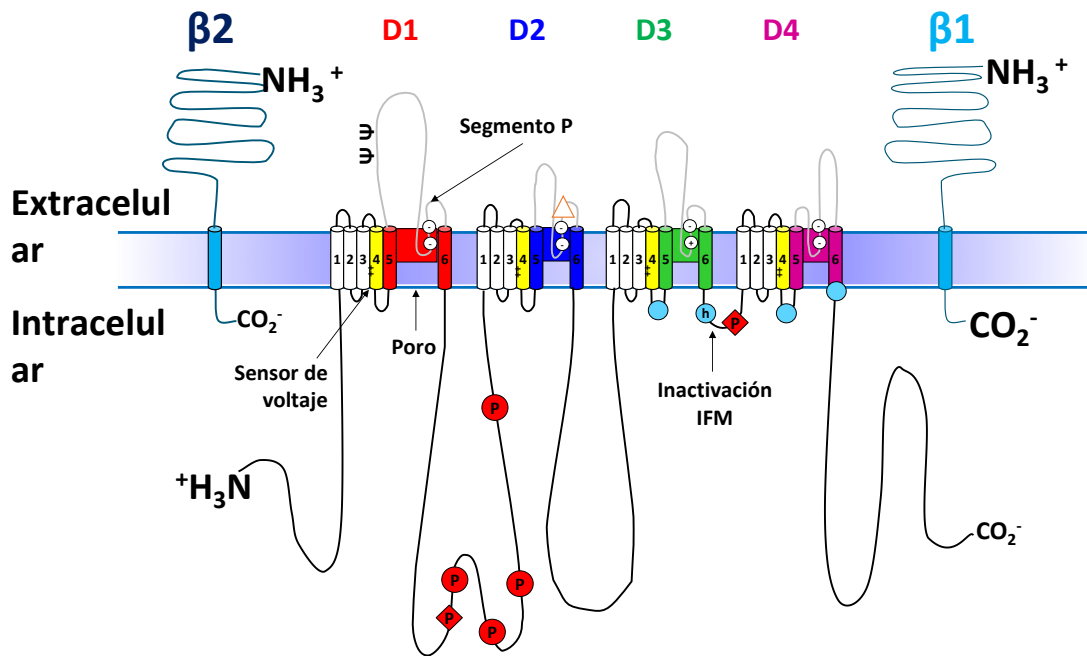
	Isoformas	Localización de los genes	Tejidos identificados	Sensibilidad a tetrodotoxina (TTX)
<b>SUBGRUPO I</b>	Na <sub>v</sub> 1.1, Na <sub>v</sub> 1.2, Na <sub>v</sub> 1.3, y Na <sub>v</sub> 1.7	Cromosoma 2	Células neuronales	Sensibles (TTX <sub>s</sub> )
<b>SUBGRUPO II</b>	Na <sub>v</sub> 1.5, Na <sub>v</sub> 1.8, y Na <sub>v</sub> 1.9	Cromosoma 3	Tejido cardíaco y ganglio de la raíz dorsal	Resistentes (TTX <sub>r</sub> )
<b>SUBGRUPO III</b>	Na <sub>v</sub> 1.4	Cromosoma 11	Músculo esquelético	Sensibles (TTX <sub>s</sub> )
<b>SUBGRUPO IV</b>	Na <sub>v</sub> 1.6	Cromosoma 15	Sistema nervioso central (SNC)	Sensibles (TTX <sub>s</sub> )

### 1.2.1. Estructura de los canales de sodio voltaje-dependientes

Los canales Na<sub>v</sub> son complejos proteicos formados de dos o tres subunidades. En el cerebro de mamíferos, el canal está compuesto de una subunidad  $\alpha$  de 260 kDa asociada con pequeñas subunidades auxiliares  $\beta_1$  (36 kDa) y  $\beta_2$  (33 kDa) (Beneski y Catterall, 1980). En el caso del músculo esquelético, la subunidad  $\alpha$  del canal se asocia solamente a la subunidad  $\beta_1$ . Estudios de clonación y secuenciación han demostrado que la subunidad  $\alpha$  está compuesta por aprox. 2000 aminoácidos, y que ésta es suficiente para obtener un canal funcional (Catterall, 2012).

Como se observa en la Figura 1, la topología del canal se puede describir como una serie de 4 dominios homólogos (denominados DI a DIV), cada uno compuesto de 6 segmentos  $\alpha$ -hélices transmembranales (S1-S6), que tienen de 19 a 27 aminoácidos y una longitud de 28 a 40 Å. Las regiones amino y carboxilo terminales así como las asas de los segmentos S2-S3 y S4-S5 de los dominios I-IV se localizan hacia el espacio intracelular, mientras que las asas de los segmentos S1-S3, S3-S4 y S5-S6 de los mismos dominios, se ubican en el espacio extracelular (Catterall *et al.*, 2005; Catterall 2012).

Las dos hélices transmembranales S5 y S6 de cada dominio, junto con el asa que las une denominada segmento P, conforman el poro selectivo del canal. Son estas unidades las que le confieren al canal sus propiedades de selectividad iónica, apertura e inactivación. Para su estudio, esta región se ha dividido en segmento S5-P, segmento P y segmento P-S6. El segmento P se compone por 10 aminoácidos cargados en su mayoría negativamente, esta característica le confiere una selectividad única al canal. Por otra parte, los segmentos S1-S4 conforman el dominio sensor de voltaje (VSD) siendo responsables de la propiedad de dependencia de voltaje del canal (Tomaselli, 1996; Catterall *et al.*, 2005; Catterall 2012).



**Figura 1. Esquema de la topología del canal de Na<sup>+</sup> voltaje dependiente (Na<sub>v</sub>).** Se muestra el esquema de la subunidad  $\alpha$  (D1-D4) y las dos subunidades  $\beta$  1 y  $\beta$  2. Los cilindros en colores rojo, azul, verde y magenta, representan los 4 segmentos que conforman el poro del canal denominados DI a DIV respectivamente; en amarillo y blanco, se muestra los 4 segmentos S4 cargados positivamente que funcionan como sensor de voltaje y los segmentos S1-S3 de cada dominio;  $\psi$ , sitios de glicosilación de las asas extracelulares; círculos rojos P, sitios de fosforilación para la PKA y los diamantes rojos P, sitios de fosforilación para la PKC; la h en un círculo azul, forman la partícula de inactivación con el motivo IFM; los círculos azules, posición de los residuos implicados en la formación de la compuerta de inactivación. Los círculos blancos entre los segmentos S5 y S6 de cada dominio ubican el anillo externo (EEDD) y el anillo interno (DEKA) que forman el filtro de selectividad y el sitio de unión a la tetrodotoxina (TTX); el triángulo naranja representa el sitio de unión de la quinolina primaquina (PQ). (Modificado de: Catterall, 2000, 2012).

Las subunidades  $\beta$  de los canales Na<sub>v</sub> son 4 glicoproteínas transmembranales  $\beta$ 1-4 y una variante de la subunidad  $\beta$ 1 producida por *splicing* alternativo ( $\beta$ 1B). Las subunidades  $\beta$  comparten una estructura similar, que consiste en una región N-terminal con un dominio extracelular semejante a las inmunoglobulinas (*Ig-like domain*) extracelular, un segmento transmembrana y un dominio intracelular pequeño (Brackenbury e Isom, 2008 y 2011).

Todas estas subunidades modifican la dependencia de voltaje del mecanismo de apertura del canal, alterando la cinética de la corriente de Na<sup>+</sup> de las subunidades  $\alpha$ , dichos efectos varían de acuerdo al tipo celular y de isoforma del canal. Por ejemplo, la coexpresión de la subunidad  $\beta$ 1 junto con algunas de las subunidades  $\alpha$  del canal Na<sub>v</sub>1.2 en ovocitos de *Xenopus laevis* incrementa la velocidad de inactivación y modifica la dependencia del voltaje de inactivación en dirección negativa (Isom *et al.*,

1992; 1994 e Isom, 2001). También la coexpresión de la subunidad  $\beta 2$  modula el mecanismo de apertura del canal pero con un efecto menor (Fozzard y Hanck, 1996).

Se sabe que la asociación de las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 3$  es de tipo no covalente con la subunidad  $\alpha$ , mientras que  $\beta 2$  y  $\beta 4$  se unen covalentemente a la subunidad  $\alpha$  por un enlace disulfuro (Brackenbury e Isom, 2008 y 2011). Poco es conocido acerca de la forma precisa de la interacción de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de los canales  $\text{Na}_v$ . Experimentalmente mediante el registro electrofisiológico de proteínas quiméricas de canales  $\text{Na}_v 1.4$  y  $\text{Na}_v 1.5$  se ha propuesto que la asociación de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del canal  $\text{Na}_v$ , se logra a través de una interfase donde participa un andamio estructural (*scaffold*) del dominio extracelular semejante a las inmunoglobulinas (*Ig-like domain*) de la subunidad  $\beta 1$ . Al respecto McCormick *et al.*, plantearon que la subunidad  $\beta 1$  presenta residuos ácidos (E4, D6 y E8) que podrían asociarse con los segmentos S5 a S6 de las asas del dominio I y IV. Mientras que Spampanato *et al.*, han propuesto gracias a un trabajo con mutaciones que el ácido glutámico 1866 localizada en el extremo N-terminal citoplasmático del canal  $\text{Na}_v 1.1$  podría ser el sitio de unión de la subunidad  $\beta 1$ . (Makita *et al.*, 1996; McCormick *et al.*, 1998; Spampanato *et al.*, 2004).

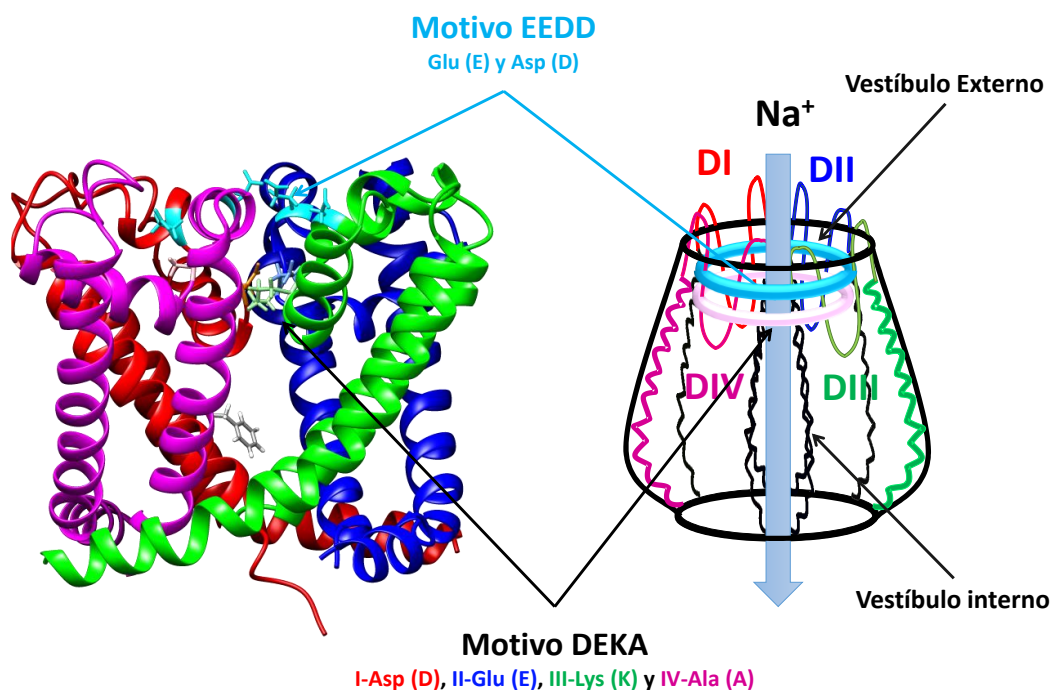
A pesar de estos y otros estudios, no se ha logrado anular completamente el efecto que tiene la subunidad  $\beta 1$  sobre el canal  $\text{Na}_v$  dejando abierta la cuestión de la base estructural precisa de la interacción de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del canal  $\text{Na}_v$  siendo un importante tema de investigación ya que se ha demostrado que es primordial para el tratamiento de enfermedades como la epilepsia (McCormick *et al.*, 1998; Spampanato *et al.*, 2004).

### 1.2.2. Relación estructura-función de los canales de sodio voltaje-dependientes

Estudios de mutagénesis sitio dirigida, así como también el uso de toxinas (guanidinas: tetrodotoxina (TTX) y saxitoxina (STX)) y anestésicos locales, han permitido demostrar que la selectividad de los canales de  $\text{Na}^+$  está determinada por dos anillos: el primero formado de 4 aminoácidos conservados que constituyen un anillo interno estrecho denominado motivo DEKA (I-Asp (D), II-Glu (E), III-Lys (K) y IV-Ala (A)) y el otro anillo más externo formado por ácidos glutámicos y aspárticos cargados negativamente que forman el motivo EEDD (Figura 2) (Cestèle S y Catterall, 2000; Stevens *et al.*, 2011).

Se sabe que el bloqueo de los canales por TTX y STX es determinado por la unión a un pequeño segmento  $\alpha$  hélice entre las regiones S5 y S6 de los dominios I- IV localizados en la boca externa del canal en donde se encuentran los anillos DEKA y EEDD, la mutación del ácido glutámico E387 del anillo

DEKA del canal Na<sub>v</sub>1.2 de cerebro de rata por una L-glutamina, impide la unión de la TTX y de la STX (Noda et al, 1989; Cestèle S y Catterall, 2000; Stevens *et al.*, 2011). La carga neta proporcionada por los aminoácidos del anillo DEKA es vital para la selectividad del canal, en ensayos de mutación sitio dirigida, se demostró que cambiando la carga negativa por una positiva la conductancia de Na<sup>+</sup> es menor, mientras que si se mantiene la carga, la conductancia no se ve afectada. También se ha demostrado que un cambio de los aminoácidos que conforman al anillo DEKA por glutamato (EEEE) cambia el tipo de selectividad iónica de Na<sup>+</sup> a Ca<sup>2+</sup> (Noda *et al.*, 1984 y 1986; Heinemann *et al.*, 1992, Yamagishi *et al.*, 2001; Stevens *et al.*, 2011).



**Figura 2. Poro iónico de la subunidad  $\alpha$  de los canales Na<sub>v</sub>.** A la izquierda se muestra un modelo *in silico* del poro y a la derecha un esquema de la posición de sus principales componentes y los residuos involucrados. En la imagen observan los dominios I (rojo), II (azul), III (verde) y IV (magenta). Se muestra el anillo externo de residuos ácidos (EEDD) (barras color cian) y el anillo interno de residuos DEKA (barras color según el dominio). También se muestra la fenilalanina del sitio de unión a anestésicos locales (LABS) (barras color gris).

### 1.3. Cinética de los canales de sodio voltaje-dependientes

Los canales iónicos tienen dos o más estados conformacionales, un estado abierto o activado que se presenta durante la despolarización de la membrana; así como también uno o más estados cerrados o desactivados que suceden durante la repolarización del canal dejando al canal viable para la siguiente despolarización (Ulbricht, 2005; Hille, 2001; Hanck y Fozzard 2007).

El canal  $Na_v$  posee dos tipos de inactivación una rápida que sucede en milisegundos y una lenta que puede durar hasta un segundo. Estos tipos de inactivación tienen mecanismos controlados por distintos segmentos del canal: la inactivación rápida es llevada a cabo por la partícula de inactivación situada en la región que une a los segmentos S6 del dominio III y S1 del dominio IV de acuerdo al modelo “cadena y bola” propuesto por Armstrong y Bezanilla. Por otro lado la inactivación lenta, que ha sido menos estudiada, se propone que sea el resultado de un cambio conformacional del poro. Se ha demostrado que la inactivación lenta no altera el acople y el desacople de la compuerta de inactivación rápida, sugiriendo que estos dos mecanismos son independientes (Armstrong y Bezanilla, 1977 y 1998; Featherstone *et al.*, 1996; Ulbricht, 2005; Hille, 2001; Hanck y Fozzard 2007).

### 1.3.1. Activación

La activación del canal de sodio es un proceso complejo que involucra cambios estructurales promovidos por aminoácidos cargados positivamente (argininas y lisinas) repetidos cada tres posiciones en el segmento S4 de cada dominio que forma parte de llamado dominio sensor de voltaje (VSD) (Noda *et al.*, 1984). El VSD es responsable de la iniciación de la activación del canal al desplazar las cargas a través de la membrana hacia el espacio extracelular en respuesta a cambios del potencial de membrana ( $E_m$ ) (p. ej. despolarización). Hirschberg *et al.*, han sugerido que aprox. 12 cargas eléctricas en el canal se mueven a través de la membrana durante la activación (Hirschberg *et al.*, 1995). Se propone que el campo eléctrico negativo presente en el interior de la membrana atrae a los residuos positivos del VSD forzando un desplazamiento hacia el interior de la célula, estos residuos se estabilizan por la interacción con residuos cargados negativamente que están conservados en las diferentes isoformas del canal  $Na_v$ . El cambio en el  $E_m$  provoca un movimiento de los segmentos S4 hacia afuera iniciando un cambio conformacional que permite la apertura del poro mediante el movimiento de los segmentos S4 hacia afuera, iniciando un cambio conformacional que abre el poro al flujo de iones (Catterall, 2012; Yarov-Yarovoy *et al.*, 2006 y 2012).

### 1.3.2. Inactivación rápida

La transmisión de los potenciales de acción en circuitos neuronales y el control de las células musculares y nerviosas requiere de la apertura y cierre rápido del canal  $Na_v$  (Catterall, 2012). La inactivación rápida del canal  $Na_v$  que se lleva a cabo en un rango de 1 a 2 ms, depende de una partícula de inactivación que se localiza en el asa intracelular que conecta el dominio III y el IV donde el motivo

de residuos de Isoleucina, Fenilalanina y Metionina (IFM) permite la unión a un sitio receptor que incluye aminoácidos hidrófobos situados en el extremo intracelular del segmento S6 del dominio IV y el asa intracelular que conecta el segmento S4 al S5 del dominio III y el S4 al S5 del dominio IV (Armstrong y Bezanilla, 1977 y 1998; Catterall, 2012). La partícula de inactivación se movería en dirección del vestíbulo interno del canal en el sitio antes descrito, apoyado por fuerzas electrostáticas y el cambio conformacional del canal posterior a la apertura. La importancia de este motivo fue demostrado por Featherstone *et al.*, quienes al mutar el motivo IFM por QQQ eliminaron la inactivación rápida demostrando igualmente que a falta de este tipo de inactivación los canales entran en inactivación lenta con mayor frecuencia, sugiriendo que la inactivación rápida protege al canal de los cambios conformacionales que llevan a la inactivación lenta del canal (Featherstone *et al.*, 1996; Ulbricht, 2005; Catterall, 2012).

### 1.3.3. Inactivación Lenta

Después de la inactivación rápida el canal entra en un periodo refractario de milisegundos durante el cual no puede volver a activarse, este periodo puede alargarse en escala de milisegundos a decimas de segundos dependiendo del nivel de despolarización que haya sufrido. Este efecto sucede debido a cambios de conformación en diferentes dominios del canal que cierran el poro iónico, este tipo de estado es denominado inactivación lenta (Hille, 2001). En ese estado el canal necesita de repolarizaciones largas (de segundos a minutos) para reestablecer su estado de reposo. La inactivación lenta es estructural, farmacológica y cinéticamente distinta a la inactivación rápida y contribuye a la regulación del potencial de membrana (Vilin *et al.*, 2001; Ulbricht, 2005). Se sabe que la inactivación lenta es diferente dependiendo del tipo de isoforma del canal por ejemplo, en los canales hNav1.4 la duración de la recuperación de la inactivación es más lenta que en los canales hNav1.5. En adición, la subunidad  $\beta 1$  también intervienen en este proceso, estudios de coexpresión de canales Nav1.4 $\alpha$  junto con la subunidad  $\beta 1$  en células de mamífero HEK293, han demostrado que la inactivación lenta es de menor rango que la observada normalmente por una despolarización de 30 segundos en células que expresan solo la subunidad  $\alpha$  del canal Nav1.4 (Chen y Cannon, 1995; Hayward *et al.*, 1997).

### 1.4. Moduladores de los canales de sodio voltaje-dependientes

Diferentes sustancias afectan la cinética de los canales de sodio voltaje-dependientes (Nav), ya sea bloqueando completamente el paso de iones o simplemente modificando la permeabilidad al

producir estados alterados de la conformación nativa del canal (Hartzell, 1996; Hille, 2001). Entre los diferentes compuestos químicos que bloquean el canal de Na<sup>+</sup> encontramos a las toxinas, anestésicos locales, antiarrítmicos y recientemente se ha propuesto que los antimaláricos de tipo aminoquinolina también modulan el canal. Muchos de estos compuestos tienen afinidad por sitios bien diferenciados localizados en distintas regiones del canal Na<sub>v</sub>, actualmente se reconocen siete sitios de interacción que modulan de forma diferente al canal. En la tabla 2 se presenta una recopilación de los sitios de interacción de fármacos o toxinas en los canales de sodio y sus efectos fisiológicos (Salinas-Stefanon *et al.*, 2011; Martínez-Morales, 2011; Catterall 2014).

**Tabla 2.** Sitios de unión a neurotóxicos en los canales de Na<sup>+</sup>.

Sitio receptor	Toxina o fármaco	Dominio	Efectos fisiológicos
<b>Sitio 1</b>	Tetrodotoxina Saxitoxina μ-Conotoxina	IS2-S6, IIS2-S6, IIIS2-S6, IV-S6, ISS5-S6	<b>Bloqueo del poro del canal</b> (Noda <i>et al.</i> , 1989; Terlau <i>et al.</i> , 1991; Lipkind y Fozzard, 1994; Narahashi 2008)
<b>Sitio 2</b>	Batracotoxina Veratridina Grayanotoxina (GTX) Aconitina	IS, IVS6	<b>Activación persistente</b> (Barnes y Hille, 1988; Lazdunski y Renaud, 1982; Wang y Wang, 1997 y 1998; Wang <i>et al.</i> , 1998)
<b>Sitio 3</b>	Toxina de escorpión tipo α Toxina de anemonas de mar Atracotoxinas (ATX)	IS5-IS6, IVS3-S4, IVS5-S6	<b>Inactivación lenta con dependencia de voltaje</b> (Catterall <i>et al.</i> , 1992; Buisine <i>et al.</i> , 1997; Chen y Heinemann, 2001; Nicholson <i>et al.</i> , 2004; Wanke <i>et al.</i> , 2009)
<b>Sitio 4</b>	Toxinas de escorpión tipo β	IS5-SS1, IIS1-S2, IIS3-S4, III2S6	<b>Promueve la activación</b> (Cestèle <i>et al.</i> , 2006; Campos <i>et al.</i> , 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2011)
<b>Sitio 5</b>	Brevetoxinas (PbTx) Ciguatoxinas (CTX)	IS6, IVS5	<b>Activación persistente y bloqueo de la inactivación</b> (Trainer <i>et al.</i> , 1994 ; Dechraoui <i>et al.</i> , 1999; Pérez <i>et al.</i> , 2011)
<b>Sitio 6</b>	δ-conotoxin	S3-S4 del DIV	<b>Inactivación lenta sin efectos en la dependencia de voltaje</b> (Leipold <i>et al.</i> , 2007)
<b>Sitio 7</b>	Pireritorides DDT	No reportado	<b>Activación persistente y/o bloqueo</b> (Bloomquist , 1996, Song <i>et al.</i> , 1996; Trainer <i>et al.</i> , 1997; Davies <i>et al.</i> , 2007)
<b>Sitio LABS</b>	Anestésicos locales Antiarrítmicos Antiepilépticos	IS6, IIIS6, IVS6	<b>Afecta la activación y produce un retardo en la inactivación</b> (Strichartz y Berde, 1998; Goodman <i>et al.</i> , 2003; Lipkind y Fozzard , 2005; Alvarenga <i>et al.</i> , 2002; Carmeliet, 1999)

\* Para el caso del canal de Na<sup>+</sup>, drogas antiarrítmicas de clase I: lidocaína y procainamida.

### 1.4.1. Toxinas

Los canales de Na<sup>+</sup> son afectados por diversos grupos de neurotóxicos animales como la tetrodotoxina (TTX) de pez globo; la saxitoxina (STX) de microalgas dinoflageladas; la veratridina y la aconitina alcaloides de origen vegetal; la batracotoxina (BTX) de ranas; así como la antopleurina A y B y ATX III de anemonas, entre otras. Estudios farmacológicos y de mutagénesis sitio dirigidas han identificado los sitios de unión específicos para un gran número de estas neurotóxicos tal y como se resumen en la Tabla 2 (Cestèle y Catterall, 2000; Denac *et al.*, 2000; Stevens *et al.*, 2011).

Debido a su alta afinidad y especificidad los neurotóxicos han servido de herramientas para el estudio de la estructura y función de los canales de Na<sup>+</sup>. Diversos trabajos experimentales han descrito que dichas toxinas se unen de forma alostérica a su sitio de unión, produciendo un cambio conformacional del canal que modifica los diferentes estados funcionales del mismo (Cestèle y Catterall, 2000; Cestele *et al.*, 2006; Catterall *et al.*, 2007; Fozzard y Lipkind, 2010).

### 1.4.2. Anestésicos locales

Los anestésicos locales (AL) son fármacos que, aplicados en concentración suficiente en su lugar de acción, impiden la conducción de impulsos eléctricos por las membranas del nervio y del músculo de forma transitoria y predecible, originando la pérdida de sensibilidad en una zona del cuerpo. Sus efectos pueden manifestarse en la mayoría de células excitables neuronales (ganglios, núcleos, nervios periféricos) y no neuronales (miocardio y músculo, entre otros) (Strichartz y Berde, 1998).

Por medio de la técnica de fijación de voltaje (*patch clamp*), se ha comprobado que estos fármacos producen analgesia al bloquear selectivamente las corrientes de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, bloqueando la fase inicial del potencial de acción. Para ello los AL deben atravesar la membrana plasmática, puesto que su acción farmacológica fundamental la llevan a cabo uniéndose al receptor en el lado citoplasmático de la misma. Esta acción se ve influenciada por el tamaño de la fibra sobre la que actúa; la cantidad de fármaco disponible en el lugar de acción; y las características farmacológicas del producto (Strichartz y Berde, 1998). Entre los AL más utilizados encontramos a la procaína, la tetracaína, la lidocaína, la bupivacaína, la ropivacaína y la benzocaína (Goodman *et al.*, 2003).

Lipkind *et al.* propusieron que en canales Na<sub>v</sub>1.4 los residuos hidrófobos F1579 y Y1586 del segmento S6 del dominio IV intracelular son los que interactúan con los AL planteando que este contiene la región de unión alostérica, la cual es solo accesible durante la apertura del canal. También se han propuesto otro sitio de interacción podría ser un bolsillo hidrofóbico como el residuo K1237 del

motivo DEKA donde la carga negativa de este residuo podría interactuar con ciertos AL protonados como la lidocaína, la etidocaína, y la mepivacaína (Lipkind y Fozzard, 2005). Se ha estudiado a través de mutaciones sitio dirigidas y experimentos electrofisiológicos en canales Nav1.4 que la mutación del residuo F1579 reduce la interacción de AL protonados como la lidocaína y la bupivacaina, proponiendo que este aminoácido es determinante para la unión de los AL a los canales de sodio (Fozzard et al., 2011).

### 1.4.3. Antiarrítmicos

Las arritmias cardíacas son el resultado de alteraciones en la formación y la conducción del impulso cardíaco. Pueden ser asintomáticas o expresarse mediante diversas manifestaciones como palpitaciones, vértigo, angina, disnea, confusión, síncope, insuficiencia cardíaca congestiva y muerte súbita. Son la causa más frecuente de muerte en pacientes que presentan un infarto agudo de miocardio. Los agentes antiarrítmicos son un grupo de medicamentos que se usan para suprimir o prevenir las alteraciones del ritmo cardíaco. Los agentes antiarrítmicos se clasifican en 4 categorías, según la clasificación propuesta por Vaughan Williams en función de sus efectos electrofisiológicos (Alvarenga *et al.*, 2002; Carmeliet, 1999). Los antiarrítmicos de la clase I son fármacos que actúan predominantemente bloqueando el canal de Na<sup>+</sup> que permite la entrada rápida de estos iones en el interior de la célula dando lugar a la despolarización celular. Sin embargo, presentan efectos sobre otros canales, lo que hace que sus efectos sean distintos. Algunos ejemplos de este tipo de antiarrítmicos son la quinidina, la procainamida, la disopiramida, la flecainida, la propafenona, la tocainida y la mexiletina. El efecto selectivo de estos fármacos se ha explicado por la interacción con un receptor asociado al canal de Na<sup>+</sup>. Estos fármacos inhiben la aparición de posdespolarizaciones tempranas o tardías al interferir con la corriente entrante de iones retardando la conducción eléctrica del corazón. (Goodman *et al.*, 2003)

### 1.5. Antimaláricos de tipo aminoquinolinas

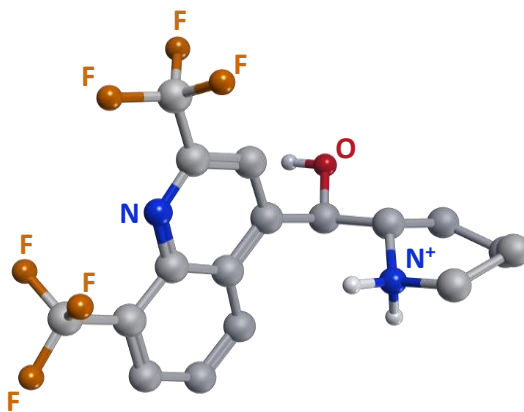
La malaria (o paludismo) es una enfermedad endémica global que representa un alto riesgo de salud pública principalmente de las regiones tropicales. Es causada por un grupo de protozoarios de la especie *Plasmodium*. En México esta enfermedad fue catalogada como problema de salud desde los años 1940's y 1950's (Secretaría de Salud de México, 2016).

El descubrimiento del agente etiológico (miembros de la familia *Plasmodium*) y su vector de transmisión (la hembra del mosquito *Anopheles pseudopunctipennis*) a finales de los años 1880's, llevó a la búsqueda metódica de un tratamiento eficaz en contra del parásito. Durante décadas la búsqueda se centró en una sola familia de fármacos denominada aminoquinolinas que originalmente fueron desarrolladas a partir de la quinolina proveniente del extracto de la corteza del árbol chinchona. Estos fármacos fueron originados a partir de la modificación secuencial y la síntesis de los fármacos utilizando como base el anillo de quinolina. Así se desarrollaron la quinidina (QN), la cloroquina (ClQ), la mefloquina (MQ) y la primaquina (PQ) (White, 2007). Actualmente para el tratamiento de la malaria se utiliza una mezcla de dos medicamento la CQ y la PQ, sin embargo se han desarrollado otros medicamentos para cepas resistentes como la MQ, sintetizada para combatir las cepas de *P. falciparum* resistentes (López–Antuñano y Schuminis, 1988; Palmer *et al.*, 1993; White, 2007).

Durante mucho tiempo se describió que la QN y la ClQ a dosis prolongadas o sobredosis causaban efectos secundarios que afectan el sistema cardiovascular. Posteriormente se estableció que las diferentes clases de antimaláricos derivados de las quinolinas presentaban un efecto cardiovascular clínicamente relevante. Estas sustancias provocan hipotensión y prolongan la despolarización ventricular dando origen a la prolongación del complejo QRS en los electrocardiogramas. Actualmente solo la quinidina se considera como un fármaco antiarrítmico de clases I y III donde su mecanismo de acción se produce por el bloqueo de canales  $Na_v$ , así como también en la corriente transitoria de salida de potasio ( $I_{to}$ ). Aunque el efecto hipotensor de las otras aminoquinolinas es conocido éste no es tan marcado como el de la quinidina. Debido a estos efectos, las aminoquinolinas, se han utilizado como herramientas moleculares para el estudio de los canales de sodio y de potasio (Orta, 2004; Martinez, 2005; White, 2007; Salinas-Stefanon, 2011).

## 1.6. Mefloquina

En la Figura 3 se muestra a la mefloquina (MQ) que es un fármaco producido a partir del programa de investigación contra el paludismo el cual se estableció en 1963 para la obtención de nuevos fármacos para combatir cepas de *P. falciparum* resistentes que surgían con mayor frecuencia en África central después de la guerra de Vietnam (Peters, 1970).



**Figura 3. Estructura química de la mefloquina.** Se muestra la estructura 3D de la MQ (IUPAC: (R)-[2,8-Bis(trifluoromethyl)-4-quinolinyll][(2S)-2-piperidinyll]methanol) (ChemSpider ID: 401792).

La MQ es una 4-aminoquinolina metanol sintética, estructuralmente relacionada con la quinina. Este fármaco puede ser clasificado como un arilaminoalcohol, similar a los alcaloides de la planta del género Chinchona. La MQ se presenta como un polvo blanco ácido, es ligeramente soluble en agua y su peso molecular es de 378.31 g/mol (Giao y de Vries, 2001). Además se ha determinado que tienen una absorción lineal a partir de 1500 mg, con una vida media de absorción de 1 hora, encontrándose picos de concentración en plasma después de 2 a 12 horas. El volumen de distribución aparente se ha calculado entre 16 a 23 l/kg y su vida media es de 27 días (Abdi *et al.*, 2003).

Diversos estudios han demostrado la eficacia antipalúdica de MQ en modelos animales y posteriormente en seres humanos, evidenciando que MQ era inocuo y eficaz contra *P. falciparum* multirresistentes; aunque no posee acción contra las formas hepáticas ni contra los gametocitos maduros de *P. falciparum* ni tampoco contra las formas tisulares latentes de *P. vivax* (Schmidt *et al.*, 1978; Goodman *et al.*, 2003).

El mecanismo de acción exacto de MQ se desconoce (Foley y Tilley, 1998; Goodman *et al.*, 2003), pero se ha postulado que los fármacos antimaláricos tipo quinonas (CIQ, QN y también MQ) interfieren con la digestión de la hemoglobina en los estadios sanguíneos del ciclo del *P. falciparum*. El parásito degrada la hemoglobina en una vacuola alimentaria, produciendo un grupo hem libre y especies reactivas de oxígeno (ERO) tóxicas; el grupo hem es neutralizado por medio de su polimerización, mientras que las ERO son detoxificadas por numerosos mecanismos antioxidantes (Foley y Tilley, 1998).

A diferencia de la QN y la CQ, las cuales se acumulan en la vacuola alimentaria e interfieren con la polimerización del grupo hem y la desintoxicación de las ERO, la MQ no inhibe la polimerasa del grupo

hem. Sin embargo, la MQ posee una gran afinidad por el grupo hem libre y estudios *in vitro* mostraron que logra inhibir su polimerización (Slater y Cerami, 1992; Dorn *et al.*, 1998). Se ha sugerido que la MQ puede actuar formando complejos tóxicos con el grupo hem libre que dañan las membranas e interactúan con otros componentes del plasmodio (Schlesinger *et al.*, 1988). La principal alteración ultraestructural producida por la MQ en el *P. falciparum*, es el daño en la turgencia de las vacuolas alimentarias del parásito, mas no su acumulación en éstas (Jacobs *et al.*, 1987; Foley y Tilley, 1998), lo que lleva a que pequeñas concentraciones incrementen el pH intravacuolar de *plasmodium* causando su destrucción; sin embargo, el mecanismo mediante el cual dicho medicamento se concentra en los parásitos es aún desconocido (Schlesinger *et al.*, 1988; Foley y Tilley, 1998; Schlagenhauf *et al.*, 2010; Goodman *et al.*, 2003; Achieng *et al.*, 2017).

Existe una marcada variación en las propiedades farmacocinéticas de la MQ. La biodisponibilidad podría depender del preparado comercial utilizado y la relación dosis-respuesta varía dependiendo del área endémica. Debido a esta variación es difícil comparar los estudios de farmacocinética y eficacia de la MQ (Giao y de Vries, 2001).

En general, la MQ es administrada por vía oral ya que las soluciones parentales producen reacciones locales irritantes e intensas. Esta se absorbe lenta, pero satisfactoriamente por la vía digestiva, proceso estimulado por la ingesta de alimento, debido al aumento del flujo en la circulación enterogástrica y enterohepática que se produce durante el proceso de digestión (Goodman *et al.*, 2003).

La MQ se une ampliamente a las proteínas plasmáticas (aproximadamente 98 %) y se concentra en los eritrocitos, que son las células blanco en la malaria, pero dicha característica la hace también un sitio potencial para interacciones farmacológicas. Posee una vida media de eliminación amplia con un promedio de 20 días y se transforma por enzimas microsomales hepáticas en su principal metabolito inactivo, el ácido 4-carboxílico de la MQ, probablemente mediado por la citocromo P450 isoenzima CYP3A4 (Goodman *et al.*, 2003).

En los seres humanos es excretada principalmente por la bilis y en cantidades muy pequeñas en la orina, (Schlesinger *et al.*, 1998; Schlagenhauf *et al.*, 2010).

Las reacciones adversas generadas por el uso de MQ son: dolor de cabeza, vértigo, mareos, ansiedad e insomnio, psicosis, amnesia, alucinaciones, convulsiones, depresión, parestesia, desorden bipolar y alteraciones cardiacas (arritmias, bradicardia e hipotensión), también se han reportado alteraciones de la piel (vasculitis cutánea, dermatitis exfoliativa y necrosis epidérmica tóxica); y

sanguíneas como es anemia aplásica severa (Aarnoudse *et al.*, 2006; Gribble *et al.*, 2000; Traebert *et al.*, 2004; Schlagenhauf *et al.*, 2010).

### 1.7. Estudios de aminoquinolinas en canales iónicos

En nuestro grupo de investigación se han demostrado los efectos secundarios de las aminoquinolinas, en particular de la primaquina sobre el sistema cardiovascular. Este efecto resulta de un mecanismo que involucra la interacción de dichos fármacos con canales iónicos. Esta interacción disminuye la corriente que fluye a través de ellos y de esta manera afecta la correcta transmisión intercelular (Tabla 3).

Los experimentos más recientes demostraron que la PQ interactúa en canales Na<sub>v</sub> clonados de corazón de humano (hNa<sub>v</sub>1.5) y de músculo esquelético de rata (rNa<sub>v</sub>1.4) expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*. En estos canales la PQ produce un bloqueo de la I<sub>Na+</sub> que es concentración y voltaje dependiente (Martínez *et al.*, 2010; Salinas-Stefanon *et al.*, 2011). Se ha propuesto que la PQ provoca este efecto mediante su interacción con el aminoácido W756 del dominio II en la boca extracelular, una región que ha sido recientemente descrita por nuestro grupo como un sitio de unión a fármacos como el tolueno, sitio que modula el canal Na<sub>v</sub> y que se localiza por encima del anillo DEKA (Cruz *et al.*, 2003; Scior *et al.*, 2009, Tsang *et al.*, 2005). El mecanismo de acción de la PQ es producido por unión electrostática del fármaco a una región en forma de anillo rica en triptófanos ocluyendo el anillo DEKA localizado por debajo (Salinas-Stefanon *et al.*, 2011, Scior *et al.*, 2011).

**Tabla 3.** Antecedentes del estudio de la interacción de los antimaláricos con los canales iónicos.

Aminoquinolina	Corriente afectada	Especie	Referencia
Cloroquina	I <sub>K1</sub> > I <sub>Kr</sub> > I <sub>Na</sub>	Perro	Cebada y Salinas, 1994
Quinidina	I <sub>to</sub>	Rata	Clark <i>et al.</i> , 1995
Cloroquina	I <sub>K1</sub> > I <sub>Kr</sub> > I <sub>Na</sub> > I <sub>Ca-L</sub>	Gato	Sánchez-Chapula <i>et al.</i> , 2001
Quinolina	I <sub>Na</sub> > I <sub>Kr</sub> <sup>a</sup> > I <sub>Ka</sub> <sup>a</sup> > I <sub>to</sub> <sup>c</sup> > I <sub>K1</sub> <sup>c</sup>	<sup>a</sup> Cobaya, <sup>c</sup> rata	Gloria, 2002
Primaquina	I <sub>Na</sub>	Perro y rata	Salinas-Stefanon y Morales-Salgado, 1998; Orta <i>et al.</i> , 2002
Primaquina	I <sub>Na</sub>	Expresión de rNa <sub>v</sub> 1.4 y hNa <sub>v</sub> 1.5 en <i>Xenopus laevis</i>	Orta, 2004; Martinez, 2005; Salinas-Stefanon, 2011

## 2. JUSTIFICACIÓN

Los canales iónicos son una gran familia de más de 400 proteínas que representan del 1 al 2 % de nuestra dotación genética, siendo los canales de sodio voltaje-dependientes ( $Na_v$ ) un ejemplo de este tipo de proteínas. La fase de despolarización rápida del potencial de acción en las células excitables nerviosas y musculares (esqueléticas, lisas y cardíacas), depende de la entrada de  $Na^+$  a través de canales  $Na_v$ . Estos canales son vitales en diferentes procesos de tejidos biológicos, que incluyen la comunicación, la secreción, así como también el fenómeno de excitación-contracción en el tejido del músculo esquelético. Su disfunción provoca un gran número de enfermedades que incluyen las arritmias cardíacas, epilepsia, dolor neuropático e inflamatorio, parálisis periódica, migraña, esclerosis múltiple, la enfermedad de Huntington y el cáncer (Clare *et al.*, 2000; Gargus, 2003; Brackenbury e Isom, 2008; Dib-Hajj *et al.*, 2010; Mantegazza *et al.*, 2010).

Se sabe que diferentes sustancias afectan la cinética del canal  $Na_v$ , ya sea bloqueando completamente el paso de iones, o simplemente, modificando la permeabilidad al producir estados alterados de la conformación nativa del canal (Hartzell, 1996; Hille, 2001).

Un grupo de fármacos conocidos como antiarrítmicos modulan los canales  $Na_v$ , inhibiendo la aparición de posdespolarizaciones tempranas o tardías al interferir con la corriente entrante de iones retardando la conducción eléctrica del corazón; y son utilizados para suprimir o prevenir las alteraciones del ritmo cardíaco (Alvarenga *et al.*, 2002; Goodman *et al.*, 2003).

Fármacos del grupo de las aminoquinolinas como la quinidina (QN) o la quinina (QIN) son utilizados con ese propósito. Otros miembros del mismo grupo químico de fármacos, como la cloroquina (CQ), la primaquina (PQ) y la mefloquina (MQ) que están dirigidos al tratamiento de la malaria muestran efectos clínicos secundarios a dosis altas o repetidas, tales como la depresión de la función cardiovascular, deficiencia de la contractilidad del miocardio y arritmias cardíacas. Se ha sugerido que estos efectos podrían relacionarse con el bloqueo de canales iónicos, probablemente por la unión reversible a los canales en estado abierto. Sin embargo, su mecanismo de acción no es claro (Snyders *et al.*, 1992; Palmer *et al.*, 1993; Nenov *et al.*, 1998; Sánchez-Chapula *et al.*, 2001; Orta-Salazar *et al.*, 2002).

Si bien, los efectos secundarios de estos fármacos sobre las corrientes de sodio plantean la posibilidad de su uso como un tratamiento farmacológico, no existen estudios acerca de la manera

como las aminoquinolinas podrían interaccionar con el canal Na<sub>v</sub>, así como los efectos moduladores de este fármaco en la conducción iónica.

En este trabajo se utilizó a la MQ como herramienta farmacológica para investigar su sitio de unión sobre el canal Na<sub>v</sub>1.4 del músculo esquelético, así como proponer su mecanismo de interacción, utilizando registros electrofisiológicos, mutagénesis puntual sitio dirigida y modelos computacionales.

### 3. HIPÓTESIS

La mefloquina establece un bloqueo de los canales de sodio voltaje dependientes Na<sub>v</sub>1.4 que inhibe la corriente de iones Na<sup>+</sup> mediante su interacción molecular con el canal.

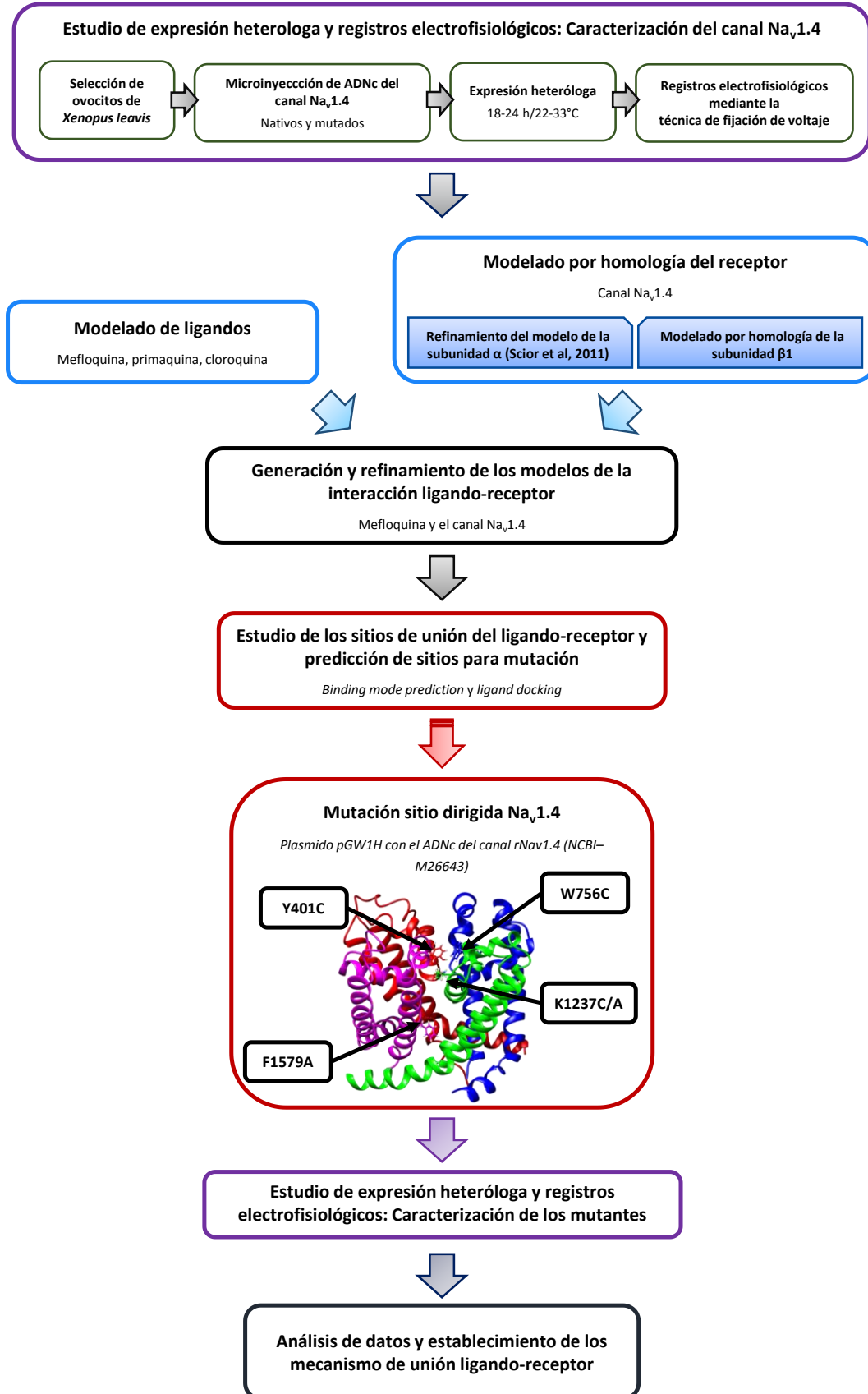
### 4. OBJETIVO GENERAL

Identificar el sitio de unión de mefloquina en el poro del canal Na<sub>v</sub>1.4, así como proponer su mecanismo de interacción, utilizando registros electrofisiológicos, mutagénesis puntual sitio dirigida y modelos computacionales.

### 5. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterizar por medio de estudios electrofisiológicos la cinética de los canales Na<sub>v</sub>1.4 sin la subunidad β1 accesoria en presencia de MQ.
2. Caracterizar por medio de estudios electrofisiológicos los efectos cinéticos de MQ en los canales Na<sub>v</sub>1.4 en presencia de la subunidad β1 accesoria.
3. Establecer a través de estudios electrofisiológicos si MQ utiliza el mismo sitio de unión que PQ probando la mutación W756C en canales Na<sub>v</sub>1.4.
4. Investigar a través de estudios electrofisiológicos si MQ podría interactuar con aminoácidos de la boca externa del canal Na<sub>v</sub>1.4 utilizando las mutantes Y401C, K1237A y K1237B.
5. Determinar a través de estudios electrofisiológicos la posible participación del sitio unión a anestésicos locales (LABS) en el mecanismo de interacción de MQ sobre el canal Na<sub>v</sub>1.4.
6. Generar y refinar estructuras computacionales por medio de modelamiento por homología de las subunidad α del canal Na<sub>v</sub>1.4; así como de las aminoquinolinas mefloquina, primaquina y cloroquina mediante mecánica molecular.
7. Simular la forma de interacción entre el ligando (mefloquina) y el receptor (canal Na<sub>v</sub>1.4) y predecir el sitio de unión del ligando utilizando estudios de acoplamiento molecular (*docking*).
8. Proponer por medio de estudios de modelamiento por homología, mutación sitio dirigida y estudios electrofisiológicos el sitio de unión de la subunidad β1 accesoria con los canales Na<sub>v</sub>1.4 para determinar su influencia sobre la afinidad de MQ en el canal.

## 6. ESQUEMA DE TRABAJO



## 7. METODOLOGÍA

### 7.1. Mutagénesis sitio dirigida específica

La técnica de mutagénesis sitio dirigida se desarrolló en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular del Centro de Química-ICUAP. Estas mutaciones fueron desarrolladas por el Dr Alfredo Sánchez Solano y la Dra. Lourdes Millán Pérez Peña en el Laboratorio de Bioquímica Y Biología Molecular del ICUAP. En el Apéndice A, se describe la metodología realizada para la obtención de las mutantes utilizadas en este proyecto.

### 7.2. Técnica de expresión de canales iónicos en ovocitos de rana

Tanto la expresión de canales y los registros electrofisiológicos se desarrollaron en el **Laboratorio de Biofísica Cardíaca del Instituto de Fisiología de la BUAP**. Los procedimientos que aquí se mencionan fueron realizados de acuerdo con la guía para el manejo y cuidado de animales de laboratorio del consejo mexicano para el cuidado animal (Norma oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999). Además el estudio fue aprobado por el comité de ética interno del Instituto de Fisiología de la BUAP. Se hicieron esfuerzos para reducir el número de animales utilizados y para minimizar el sufrimiento de los animales.

#### Obtención de ovocitos

La rana *Xenopus laevis* (*Xenopus* 1; Ann Arbor, MI. USA) fue anestesiada por inmersión durante 30 min en una solución de Tricaína (0.2 % de ácido 3-aminobenzoico etil-éster) (Sigma); una vez anestesiada se sometió a una cirugía abdominal para obtener los lóbulos ováricos que contienen a los ovocitos.

#### Cirugía

Se realizó una pequeña incisión de aprox. 3 mm en el abdomen, removiendo secciones de los lóbulos ováricos cortando porciones pequeñas de aproximadamente 1 cm, colocándolas en una caja Petri con la solución buffer OR-2 (NaCl 82.5 mM; KCl 2.5 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; HEPES 5 mM, pH 7.6 NaOH) (Li *et al.*, 1999). Durante todo el transcurso de la cirugía la rana se mantuvo en una cama fría y constantemente humectada con solución OR-2.

#### Proceso enzimático

Los lóbulos ováricos fueron colocados en tubos de ensayo previamente llenados con colágenasa (colágenas tipo 1A Sigma, 1.3 mg/ml) disuelta en la solución buffer OR-2. Se realizaron

tres periodos de agitación mecánica en la solución (en forma orbital) dos periodos de 30 min y uno de 15 min, con lavado y cambio de solución enzimática entre los periodos (solución buffer OR-2). Dicho proceso nos permitió separar a los ovocitos de los lóbulos ováricos y también remover el tejido folicular que recubre a cada ovocito.

Después de la digestión enzimática los ovocitos fueron colocados en una caja Petri con solución ND-96 (NaCl 96 mM; KCl 2.5 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM; HEPES 5 mM; ácido pirúvico 5 mM; teofilina 0.5 mM; gentamicina 50 µg/ml, pH 7.6 NaOH) (Sah *et al.*, 1998), lavando antes 3 veces con la solución ND-96 para remover la solución OR-2.

### Selección de ovocitos

Posteriormente se seleccionaron los ovocitos que tenían una forma esférica bien definida con una división clara entre ambos polos (animal y vegetal), y con un diámetro aprox. de 1 mm (diámetro que corresponde a los estadios V y VI, ovocitos maduros).

### Inyección de ovocitos

En esta parte del procedimiento se utilizó ADN<sub>c</sub> del canal rNav<sub>v</sub>1.4 (Uniprot ID: P15390) en estado nativo y mutado subclonado en el vector pGW1H (British Biotechnology). Dependiendo del experimento también se añadió en una proporción 1:4 el ADN<sub>c</sub> de la subunidad rNav<sub>v</sub>β1 nativa o mutada (GenBank ID: M26643) subclonada en el vector pGEMHEnew. La razón por la que se utilizó ADN<sub>c</sub> fue debido a la facilidad del manejo y de los resultados óptimos que se obtienen con su aplicación.

Para la transfección del ADN<sub>c</sub> se realizó la técnica de inyección intranuclear empleando un microinyector automático (Nanoliter 2000 Pump-head y Micro4TM pump controller, WPI, Sarasota, FL. USA). A cada ovocito se le micro-inyectó un total 1.2 a 1.5 ng de ADN<sub>c</sub> disuelto en 30 nl agua estéril.

Finalmente los ovocitos fueron incubados en la solución ND-96 durante un periodo de 18 a 24 h a 18°C.

## **7.3. Registros electrofisiológicos**

Los registros electrofisiológicos se desarrollaron en los ovocitos después de 18 a 24 h postinyección a temperatura ambiente (22-23°C) utilizando la técnica de fijación de voltaje por doble microelectrdo (Methfessel *et al.*, 1986). La solución para registro contenía NaCl 96 mM; KCl 2.5 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; BaCl<sub>2</sub> 1 mM; HEPES 5 mM, pH 7.6 (Li *et al.*, 1999) y el intercambio de soluciones

se realizó utilizando un sistema de perfusión (Val404<sup>®</sup>, CIDES Tecnología, México). Los electrodos de cristal de borosilicato (TW120F-6, WPI, Sarasota, USA) fueron pulidos utilizando un estirador de micropipetas p-97 (Sutter Instruments, Novato, CA) y fueron llenados con KCl 3 M para tener una resistencia final de 0.2 a 1.2 MΩ (Schreibmayer *et al.*, 1994).

Las corrientes de sodio (I<sub>Na+</sub>) fueron filtradas a 2 kHz, digitalizadas a una tasa de muestreo de 10 kHz mediante un convertidor Digidata 1200 análogo a digital (Axon Instruments, Foster City, CA) conectado a un amplificador Warner OC -725C (Warner Instrument Corp., Hamden, USA) que fue dirigido utilizando el programa pClamp8 (Axon Instrument, Union City, CA, USA) y el cual también nos sirvió para el análisis de los archivos generados.

Solamente fueron utilizados registros de ovocitos con corrientes menores a 7 μA para minimizar los errores en el control de la fijación de voltaje, y con corrientes de fuga (*leak currents*) manteniendo el *leak* por debajo del 1.4 % de la corriente total (Tsushima *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1999).

#### 7.4. Protocolos experimentales y análisis de datos

Los protocolos de estimulación utilizados para estudiar la cinética del canal Na<sub>v</sub>1.4 y el método de análisis serán descritos a continuación. En los experimentos a menos que se diga lo contrario el fármaco utilizado fue el isómero (R, S) de mefloquina (MQ) (Sigma-Aldrich, USA code: M2319, PubChem CID: 65329).

##### Protocolo de Activación

Para generar la corriente de Na<sup>+</sup> en el ovocito se aplicó un protocolo de pulsos despolarizantes partiendo de un potencial de sostenimiento de -100 mV hasta +50 mV en incrementos de 10 mV con una duración de 30 ms (Figura 4A). Para construir la relación corriente contra voltaje (IV) se midió la magnitud de la I<sub>Na+</sub> generada en cada paso de voltaje y se normalizó contra la I<sub>Na+</sub> máxima obtenida en condiciones control; estos valores después fueron graficados en función del potencial de membrana.

##### Determinación de la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>)

Para determinar la concentración inhibitoria de MQ a la cual se obtiene el 50 % del efecto (IC<sub>50</sub>) sobre los canales Na<sub>v</sub> se obtuvieron datos del efecto de MQ a diferentes concentraciones. Estos datos fueron presentados en una curva con escala logarítmica y ajustados con la **ecuación de Hill** (Ecuación 1).

$$y = V_{max} \left( \frac{x^n}{k^n + x} \right) \quad (1)$$

Donde  $y$  es la corriente inhibida normalizada,  $V_{max}$  es la inhibición máxima,  $x$  es la concentración del fármaco (mefloquina),  $n$  es el coeficiente de Hill, y  $k$  es la  $IC_{50}$ .

#### Determinación del curso temporal de la inhibición de la $I_{Na+}$

Para determinar el tiempo de instalación de bloqueo por MQ, se aplicó un protocolo de curso temporal en el cual se aplicaron pulsos cuadrados repetidos a -20 mV manteniendo un potencial de sostenimiento de -100 mV con un reposo entre cada pulso de 1000 ms, mientras se perfundió el fármaco y hasta alcanzar la estabilización de la corriente. Posteriormente se realizó el lavado de la misma forma. Las amplitudes máximas de la  $I_{Na+}$  de cada pulso se graficaron en función del tiempo y se ajustaron a una función de exponencial simple (ecuación 2).

$$y = A_1 \cdot e^{-x/\tau} + y_0 \quad (2)$$

Donde  $A_1$  es la fracción de corriente de inactivación relativa,  $\tau$  es la constante de tiempo,  $x$  es el tiempo, y  $y_0$  es la amplitud del componente de estado estable.

#### Calculo de la conductancia

La conductancia del sodio ( $g_{Na+}$ ) se calculó a partir de los datos obtenidos de la relación corriente contra voltaje (IV). Mediante la ecuación para el cálculo de la conductancia (Ecuación 3).

$$g_{Na+} = \frac{I_{Na+}}{E_m - E_{eq}} \quad (3)$$

Donde  $I_{Na+}$  es la amplitud de la corriente correspondiente a cada valor del potencial de membrana ( $E_m$ ), y  $E_{eq}$  es el potencial de equilibrio del  $Na^+$  (cuyo valor teórico es de +40 mV). Los datos obtenidos fueron normalizados con respecto a la conductancia máxima ( $g_{max}$ ) y ajustados utilizando la ecuación de distribución de Boltzmann (Ecuación 4).

$$I_{Norm} = \frac{1}{(1 + e^{[(V-V_{1/2})/dx]})} + A \quad (4)$$

Donde  $V$  es el potencial del pulso condicionante,  $V_{1/2}$  es el voltaje medio de inactivación,  $dx$  es la pendiente,  $A$  es la amplitud del componente cuando no inactiva (amplitud residual).

#### Protocolo de recuperación de la inactivación

La recuperación de la inactivación de la  $I_{Na+}$  fue estudiada utilizando un protocolo de doble pulso (Figura 4B). En estos experimentos, la  $I_{Na+}$  es inactivada por la aplicación de un pulso condicionante de -20 mV durante 500 ms teniendo un potencial de sostenimiento de -100 mV, después de aplicar este pulso condicionante se retorna al potencial de sostenimiento durante un

periodo de tiempo variable ( $\Delta t = 1 - 10,000$  ms) antes de aplicar un segundo pulso (pulso de prueba) a  $-20$  mV durante 20 ms. El curso temporal de la recuperación de la inactivación fue determinado midiendo la relación de la amplitud de la  $I_{Na^+}$  del pulso de prueba en relación a la amplitud de la  $I_{Na^+}$  del pulso condicionante, posteriormente esta relación es graficada en función del tiempo y los datos graficados son ajustados con una *función exponencial simple* (ver Ecuación 2).

#### Protocolo de Inactivación de estado estable

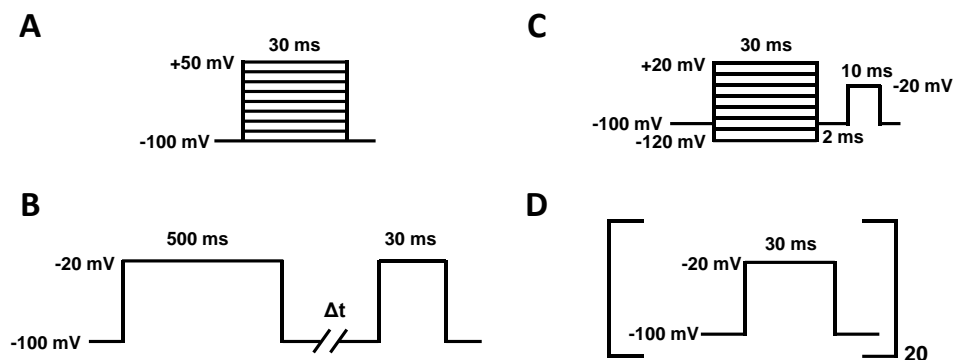
Para analizar el efecto de inactivación de estado estable se empleó un protocolo convencional de doble pulso (Figura 4C). Este protocolo tuvo un potencial de sostenimiento de  $-100$  mV y se aplicaron pulsos condicionantes de  $-120$  a  $+20$  mV con una duración de 30 ms con incrementos de 10 mV, cada pulso fue seguido por un retorno al potencial de sostenimiento durante 2 ms y posteriormente se aplicó un pulso de prueba a  $-20$  mV con duración de 25 ms. Para obtener la relación de inactivación de estado estable se midió la magnitud de la  $I_{Na^+}$  generada por el pulso de prueba y se normalizó en relación a la  $I_{Na^+}$  máxima, posteriormente se graficó en función del potencial de membrana del pulso condicionante y finalmente los datos fueron ajustados utilizando la *ecuación de distribución de Boltzmann* (ver Ecuación 4).

#### Protocolo de dependencia de uso y frecuencia

Para estudiar la dependencia de uso y frecuencia se utilizó un protocolo que consiste en la aplicación de trenes de estimulación de 20 pulsos cada uno a  $-20$  mV durante 30 ms partiendo de un potencial de sostenimiento de  $-100$  mV. Estos trenes de estimulación se aplicaron a tres diferentes frecuencias: 1 Hz, 2 Hz y 5 Hz. Para su análisis las  $I_{Na^+}$  de cada pulso fueron normalizadas en relación a la  $I_{Na^+}$  del primer pulso de cada prueba y graficadas en función del número de pulso (Figura 4D).

### **7.5. Análisis de datos y pruebas estadísticas**

Todas las gráficas y ajustes se realizaron utilizando los programas comerciales con licencias adquiridas OriginPro8 (OriginLab Corp. Northampton, MA, USA) y SigmaPlot 12.5 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Todos los datos son presentados como la media  $\pm$  ESM. La significancia de la diferencia entre conjuntos de valores control y tratados con fármaco se calcularon mediante la prueba *t-student* pareada. La prueba de ANOVA de una vía se utilizó para la comparación de dos o más medias y fue seguida de por una prueba pareada de comparación múltiple de *Tukey*. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativa cuando  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  o  $p < 0.001$ .



**Figura 4. Esquemas de los protocolos de estimulación.** Se observa una representación de los tiempos y los voltajes aplicados en (A) el protocolo de activación; en (B) el protocolo de recuperación de la inactivación; en (C) el protocolo de inactivación de estado estable; en (D) el protocolo de dependencia de uso y frecuencia; que se utilizaron para los estudios electrofisiológicos de los canales Nav.

## 7.6. Experimentos *in silico*

La bioinformática es un área muy útil para la caracterización molecular, donde se utilizan bases de datos informáticas y algoritmos computacionales que permiten conocer mecanismos fundamentales de los sistemas biológicos relacionados con la estructura y la función de las macromoléculas (Pevsner, 2009). Al contrario de los ensayos *in vivo* o *in vitro*, los análisis *in silico* no poseen una metodología precisa establecida, esto se debe a que cada análisis propone un reto único y la habilidad de predicción de las propiedades en los distintos modelos deben estar sustentadas en datos empíricos que deben reunirse, alimentarse y actualizarse en los diferentes programas. Esta fase de la investigación y preparación es la que consume la mayor parte del tiempo en este tipo de estudio, ya que es la parte más esencial del estudio puesto que define el éxito o el fracaso del análisis. Si no se hace una investigación exhaustiva de los parámetros y fundamentos de los datos, se podrían obtener resultados incontrolados, aleatorios, confusos e incluso falsos.

A continuación se describen los métodos que se utilizaron en los experimentos *in silico* y que se desarrollarán en este trabajo con el objetivo de establecer modelos computacionales que expliquen las interacciones generadas entre la MQ y el canal Nav1.4. Estos análisis se realizaron en el **Laboratorio de Simulaciones Moleculares Computacionales del Depto. de Farmacia de la FCQ-BUAP.**

### 7.6.1. Modelado de las proteínas y fármacos

En los estudios de interacciones proteína-ligando, cuando no se dispone de una estructura resuelta de la proteína, se pueden utilizar modelos teóricos, normalmente obtenidos por el método de modelamiento por homología (*Homology Modeling*), utilizando información de estructuras cristalográficas conocidas. En el modelamiento por homología, para la construcción del modelo tridimensional de la proteína de estructura desconocida, se utilizan una o más proteínas similares en secuencia (denominadas homólogas) y con estructura conocida denominada molde o plantilla. Esta aproximación se fundamenta en dos hechos: i) el conocimiento de que la estructura primaria de una proteína define las características de su estructura terciaria, de este modo, un pequeño cambio en la secuencia de una proteína, normalmente resulta en un pequeño cambio en su estructura. ii) que los sitios responsables de la actividad o de unión a ligandos de muchas proteínas poseen estructuras conservadas. Esta técnica es el mejor método de predicción de modelos estructurales cuando no se posee una estructura cristalizada de la proteína, ya que es el único método que puede predecir estructuras con una exactitud comparable a la obtenida para estructuras a baja resolución con cristalografía de rayos X (Paiz, 2012).

En este estudio, varios modelos fueron generados por homología, para esto se utilizaron secuencias recopiladas de las bases de datos de *Protein database* (Protein) del NCBI (NCBI, 2010) y *UniProt Knowledgebase* (UniProtKB) de EMBL-EBI (Pundir, *et al.*, 2017). Las estructuras cristalográficas fueron buscadas y recopiladas de la base de datos de *RCSB Protein Data Bank* (RCSB PDB) (Berman *et al.*, 2002). Se utilizaron los programas *MODELLER 9.12* (Webb y Sali, 2014) y *MOE 2014.09* (Maier y Labute, 2014) para el modelado. Para la visualización y manejo de los modelos se emplearon los programas *SwissPDB viewer 4.1* (Guex y Peitsch, 1996), *Chimera 1.11.2* (Pettersen, *et al.*, 2004), *PyMol 1.8* (Schrödinger LLC., 2015), *Discovery Studio 4.5* (Dassault Systèmes, 2016).

Para el modelado de las estructuras de los fármacos se consultaron las bases de datos *PubChem Compound* del NCBI (NCBI, 2010), *ChemSpider* de la *Royal Society of Chemistry* (Chemist, 2001) y *DrugBank 4.0* del *Canadian Institutes of Health Research* (Law, *et al.*, 2014). Para generar y refinar los modelos se utilizaron los programas con licencia comercial *MOE 2014.09* (Maier y Labute, 2014), *HyperChem Professional 8.0* (Hypercube, Inc., Florida 32601, USA) y el programa gratuito *Vega ZZ 3.0.5* (Pedretti, *et al.*, 2004).

### 7.6.2. Estudio de acoplamiento molecular (*docking*)

El estudio de acoplamiento molecular (*docking*) es un método computacional donde un compuesto se posiciona en el sitio de unión y se evalúa su efecto potencial a partir de la energía de interacción proteína-ligando. Este tipo de método es bastante útil ya que permite predecir sitios de interacción, que después pueden ser comprobados mediante estudios empíricos. Se utilizan frecuentemente cuando se dispone de la estructura resuelta de la proteína o bien de un modelo de la misma construido por homología ahorrando mucho tiempo en la búsqueda de interacciones farmacológicas (Hetényi y van der Spoel, 2002). Un protocolo de acoplamiento molecular (*docking*) se caracteriza tradicionalmente por dos aspectos: el acoplamiento en sí mismo, es decir, el método seguido para muestrear el espacio conformacional del complejo ligando-receptor, y la función de *scoring* utilizada para evaluar la afinidad de la interacción ligando-macromolécula (Aqvist *et al.*, 1994). Existen diferentes algoritmos para encontrar configuraciones proteína-ligando próximas a la conformación nativa del complejo cristalizado y su cálculo es la parte que requiere más tiempo computacional (Muegge y Rarey, 2001).

En este trabajo, utilizaron los programas *Autodock 4* (Morris, *et al.*, 2009), *autodock Vina* (Trott y Olson, 2010) y el programa *Dock* de *MOE* (Maier y Labute, 2014) para establecer la relación de interacción entre el fármaco MQ y las el canal de Nav1.4 a través de un análisis de acoplamiento molecular (*docking*). Un resumen de la teoría necesaria para la comprensión de estos análisis se encuentra en el apéndice B.

### 7.6.3. Dinámica molecular

Una de las estrategias más utilizadas para desarrollar modelos *in silico* es la técnica de dinámica molecular (DM) (Karplus y Lavery, 2011). En esta técnica un sistema de N partículas que interaccionan entre ellas es descrito de manera numérica utilizando las leyes de movimiento de Newton, describiendo de manera temporal y en detalle el movimiento, la trayectoria y las interacciones de las moléculas del sistema (átomos o conjunto de átomos, moléculas o conjunto de moléculas) (Meller, 2001). De esta manera se genera un modelo que simula el movimiento de partículas individuales en función del tiempo que obedece a las leyes de física clásica. Se recomienda al lector consultar el capítulo “1.09 Molecular Dynamics” de Cai *et al.*, para una mejor comprensión de la teoría relacionada con los análisis desarrollados con dinámica molecular (Cai *et al.*, 2011).

En este trabajo se desarrollaron simulaciones del canal Nav1.4 mediante el programa NAMD (Phillips *et al.*, 2005), que se realizaron con el apoyo de **Dr. Ángel A. Islas Navarrete**, utilizando la infraestructura del **Laboratorio Nacional de Supercomputo (LNS) del Sureste de México**. Las trayectorias fueron visualizadas y analizadas con el programa VMD (Humphrey *et al.*, 1996). Se hicieron análisis de interacción de ajuste inducido (*induce-fit*) con el programa Dock de MOE utilizando estados conformacionales (*Snapshots*) tomados a diferentes tiempos de la simulación de dinámica molecular.

Para el cálculo de otras propiedades bioquímicas necesarias para el desarrollo de los modelos computacionales de las estructuras estudiadas, que no se tratan en esta sección, se describirán para cada caso en el la sección de resultados.

## 8. RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados que permitieron dilucidar el mecanismo de interacción entre el canal Nav1.4 y el fármaco mefloquina (MQ). Con el fin de dar una mejor claridad de los resultados se describirá brevemente su orden de aparición, así como la contribución que estos tuvieron en el proyecto.

En la *Sección 8.1* se presentarán los resultados que corresponden al primer objetivo de este trabajo que es la caracterización de la cinética de los canales Nav1.4 sin la subunidad  $\beta 1$  accesoria en presencia de MQ llevada a cabo mediante estudios electrofisiológicos. Estos estudios nos permitieron establecer el efecto que MQ tiene sobre condiciones cinéticas intrínsecas del canal. Los resultados nos permitieron conocer más acerca de la interacción de MQ con el canal y además, permitieron tener un punto de comparación para el estudio de las mutantes.

En la *Sección 8.2* se mostrarán los resultados relacionados al segundo objetivo del trabajo acerca del estudio cinético de los canales Nav1.4 coexpresados con la subunidad  $\beta 1$  llevados a cabo mediante métodos electrofisiológicos y que nos permitieron dilucidar la influencia farmacológica de la subunidad  $\beta 1$  sobre la afinidad de MQ al canal.

En la *Sección 8.3* se expondrán los resultados de los objetivos tercero, cuarto y quinto de la tesis en donde se estudia por medio de mutaciones sitio dirigidas y métodos electrofisiológicos la participación de aminoácidos localizados en la boca externa del canal (E756, Y401 y K1237) y en el vestíbulo interno (F1579) que nos permitieron desestimar o demostrar sitios de unión de la MQ a los canales Nav1.4.

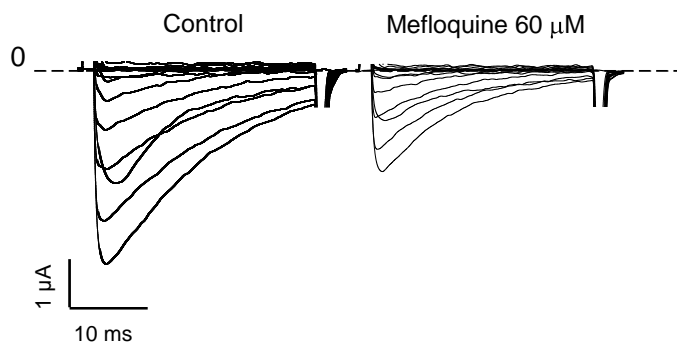
En la *Sección 8.4* se explicarán los resultados relacionados con el sexto y el séptimo objetivo de la tesis en el cual se crearon y refinaron los modelos estructurales del canal Nav1.4 y los fármacos MQ, PQ y CIQ. Que después fueron utilizados para determinar un modelo de la interacción entre los canales Nav1.4 y MQ por medio de estudios de dinámica molecular y acoplamiento molecular (*docking*).

En la *Sección 8.5* se presentarán los resultados del análisis realizado para el establecimiento de aminoácidos importantes para la interacción entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de los canales Nav1.4 que se realizaron con la idea de dar claridad al efecto farmacológico que tiene la subunidad  $\beta 1$  en la afinidad de la MQ por el canal.

### 8.1. Efecto de mefloquina sobre las corrientes de sodio de canales Na<sub>v</sub>1.4 sin la subunidad β1

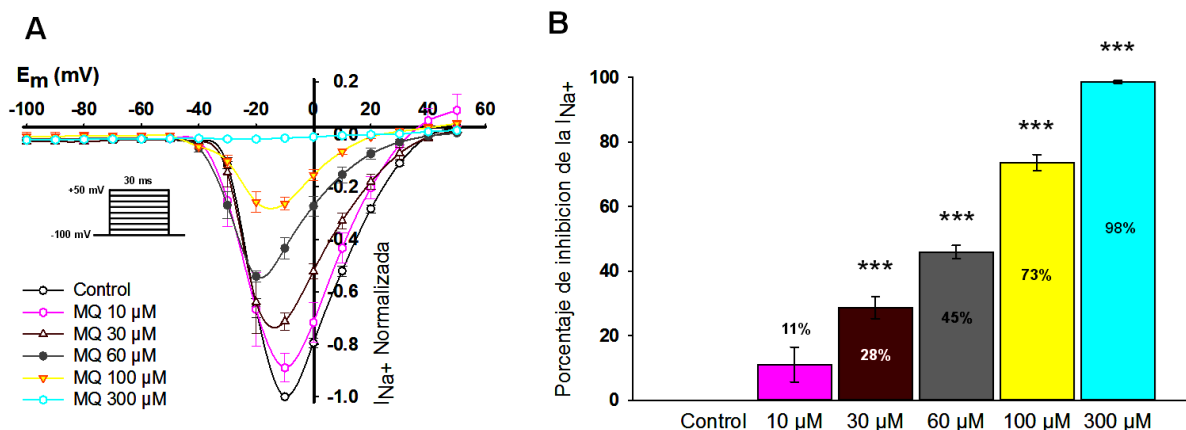
Para demostrar el efecto de MQ sobre las corrientes iónicas de Na<sup>+</sup> (I<sub>Na+</sub>), se realizaron estudios en canales expresados en un modelo de expresión heteróloga. El modelo utilizado fueron ovocitos de *Xenopus laevis*, un sistema bastante útil y muy utilizado para el estudio electrofisiológico de canales iónicos, ya que se ha demostrado que los canales poseen propiedades funcionales similares al canal expresado en el tejido original (Hanck y Fozzard, 2007).

Como se observa en la Figura 5, MQ disminuye la amplitud de I<sub>Na+</sub> en canales Na<sub>v</sub>1.4 silvestres expresados en ovocitos de *X. laevis*.



**Figura 5. Efecto inhibitorio de mefloquina sobre la I<sub>Na+</sub>.** Se muestran un grupo de I<sub>Na+</sub> obtenidas mediante la técnica de fijación de voltaje con doble microelectrodo en condiciones control (Izquierda) y tratadas con MQ a 60 μM (Derecha) en canales Na<sub>v</sub>1.4 expresados en ovocitos de *X. laevis*. Se puede observar el efecto inhibitorio de la corriente I<sub>Na+</sub> debido a la aplicación de MQ.

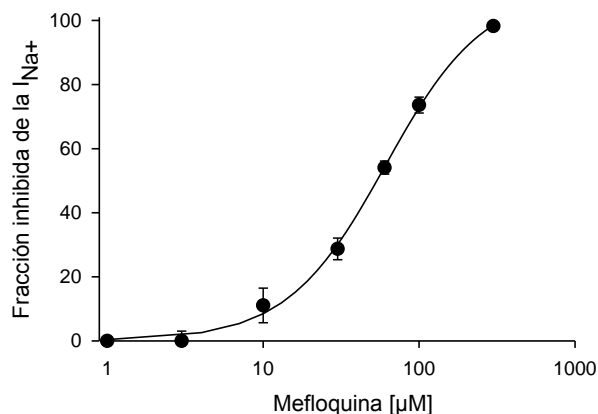
En un estudio utilizando diferentes concentraciones se determinó que esta inhibición de la corriente es dependiente de la concentración de MQ (Figura 6A), ya que aplicando diferentes concentraciones del fármaco (10, 30, 60, 100, y 300 μM) se observa un efecto que va del 10 al 98 % de inhibición de la I<sub>Na+</sub> (Figura 6B). Una propuesta a este fenómeno es que al incrementar el número de moléculas de MQ estas pueden bloquear un número mayor de canales inhibiendo así la corriente iónica en proporción a la concentración utilizada.



**Figura 6. Efecto de diferentes concentraciones de MQ sobre la  $I_{Na^+}$ .** En (A) se muestra la relación corriente contra voltaje en presencia de diferentes concentraciones de MQ (10, 30, 60, 100 y 300  $\mu M$ ) ( $n = 6$ ). En (B) se muestra el porcentaje de inhibición de la  $I_{Na^+}$  a diferentes concentraciones de MQ (10, 30, 60, 100 y 300  $\mu M$ ) (\*\*\*) ( $p < 0.001$ ). Se puede observar la dependencia de la concentración en el efecto que tiene MQ sobre las corrientes iónicas a diferentes potenciales.

### 8.1.1. Concentración inhibitoria media de canales $Na_v1.4$ sin la subunidad $\beta 1$

Al graficar el porcentaje de inhibición normalizada de la  $I_{Na^+}$  en función de la concentración de MQ aplicada y ajustándola con la ecuación de Hill calculamos la concentración inhibitoria media (*half maximal inhibitory concentration*-  $IC_{50}$ ), es decir la concentración a la cual el 50 % de los canales se encuentran inhibidos por MQ. Se estableció entonces que en canales  $Na_v1.4$  sin la subunidad  $\beta 1$  la  $IC_{50}$  es de  $66.8 \pm 2 \mu M$  ( $n = 6$ ) y el coeficiente Hill corresponde  $1.1 \pm 0.2$  (Figura 7).



**Figura 7. Curva concentración-efecto de MQ sobre los canales  $Nav1.4$ .** Se muestra la curva concentración-efecto utilizando concentraciones de 1, 3, 10, 30, 60, 100 y 300  $\mu M$  de MQ sobre el canal  $Nav1.4$  ( $n = 6$ ), el ajuste de los datos experimentales mediante la ecuación de Hill, nos proporcionó una  $IC_{50}$  de  $66.8 \pm 2 \mu M$ , con un número de Hill de  $1.11 \pm 0.2$ .

Tomando en consideración estos resultados, los siguientes experimentos se llevaron a cabo a una concentración de 60 μM cercana a la IC<sub>50</sub> calculada para MQ en canales Na<sub>v</sub>1.4.

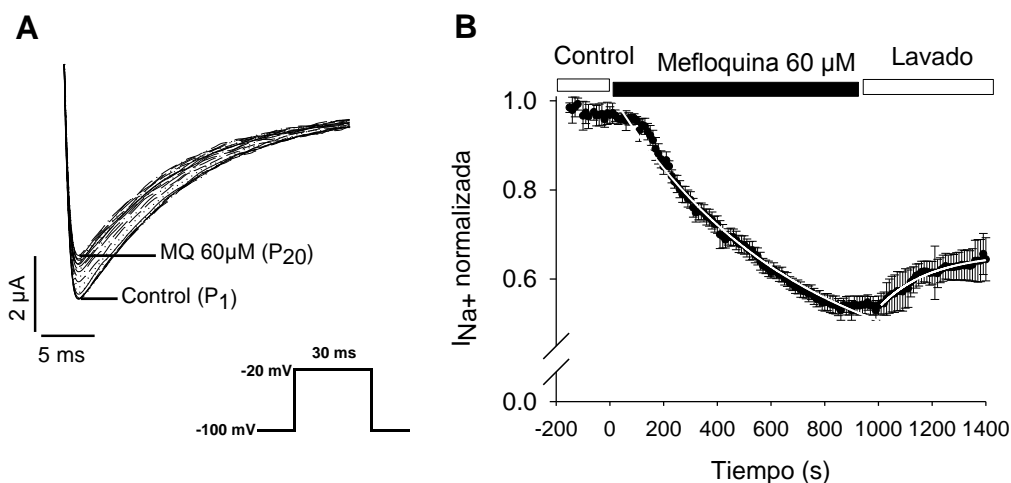
### 8.1.2. Curso temporal del efecto de mefloquina sobre la corriente de sodio de canales Na<sub>v</sub>1.4 sin la subunidad β1

Para estudiar como MQ podía interactuar sobre los canales Na<sub>v</sub>1.4 a lo largo del tiempo, se analizó el curso temporal de la I<sub>Na+</sub> en presencia de MQ a concentración de 60 μM (MQ 60 μM).

En la figura 8, se muestra el curso temporal de la corriente de sodio (I<sub>Na+</sub>) normalizada de 5 ovocitos; los datos se normalizaron dividiendo el valor de la corriente de sodio entre la amplitud máxima de la I<sub>Na+</sub> obtenida en condiciones control. En el gráfico, los primeros 10 puntos representan la I<sub>Na+</sub> en condiciones control, el tiempo de perfusión de MQ 60 μM se representa con una línea y se muestra la disminución de la I<sub>Na+</sub> normalizada (Figura 8A), una vez instalado el efecto se prosiguió con el lavado.

La curva de disminución de la I<sub>Na+</sub> en el tiempo, durante la perfusión de la MQ de cada ovocito, fue ajustada con una exponencial simple de decaimiento y el promedio de las constantes de tiempo nos proporcionó: una  $\tau_{on} = 668 \pm 0.02$  s (n=5). Una vez instalado el efecto máximo de la inhibición de la I<sub>Na+</sub> de  $45.9 \pm 2.0$  % ver Figura 8B, se analizó la recuperación de la I<sub>Na+</sub> durante el lavado del fármaco. El promedio de los ajustes mediante una función exponencial de crecimiento simple, reportó una recuperación del efecto con una  $\tau_{off} = 190 \pm 23$  s (n=5) y una recuperación de la I<sub>Na+</sub>  $64.4 \pm 0.05$  % después de 6 min. Como se puede observar, no hay recuperación del efecto de la MQ sobre la I<sub>Na+</sub>, indicándonos que el tiempo de disociación entre MQ y su sitio receptor en el canal es muy lenta.

Este resultado, nos sugiere que la MQ es muy afín a su sitio receptor, y dicha afinidad ocasiona que la recuperación del efecto de bloqueo sea muy lenta, tal y como ocurre con otros fármacos que producen bloqueo dependiente de uso (Baukrowitz y Yellen, 1996a).

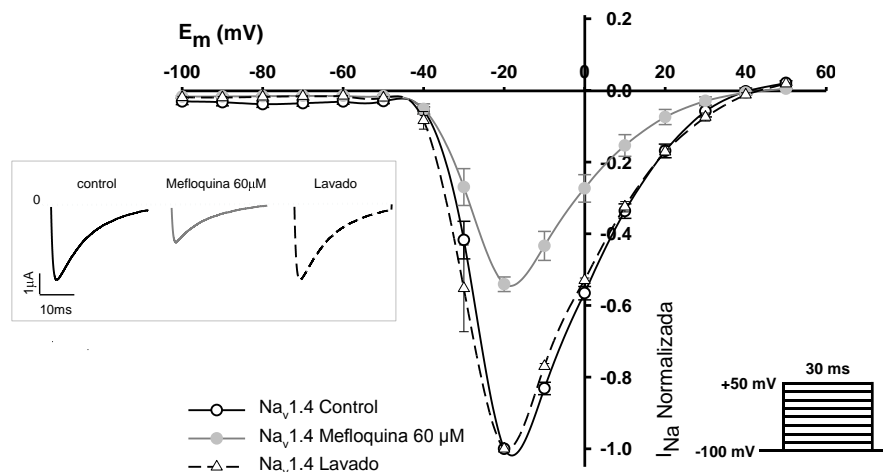


**Figura 8. Curso temporal del efecto de MQ sobre la corriente de los canales  $Na_v$  1.4.** En (A) se observa un conjunto de trazos representativos obtenidos en los registros de los ovocito mediante el protocolo mostrado en el inserto. En (B) se muestra el curso temporal del efecto de la MQ y la recuperación de la  $I_{Na^+}$  de los canales  $Na_v$  1.4 durante el lavado del fármaco (indicado por las líneas superiores). El ajuste de los datos muestra una instalación del efecto  $\tau_{on} = 668 \pm 0.02$  s y una recuperación del efecto  $\tau_{off} = 190 \pm 23$  s ( $n=5$ ). Note que la recuperación de la  $I_{Na^+}$  después del lavado es muy lenta después de la perfusión de la MQ aquí sólo se muestra el seguimiento de la recuperación hasta 6 min después del inicio del lavado.

### 8.1.3. Relación corriente contra voltaje de canales $Na_v$ 1.4 sin la subunidad $\beta$ 1

Para establecer el efecto de la inhibición de MQ 60  $\mu$ M sobre la corriente de sodio a diferentes voltajes, se utilizó un protocolo de estimulación de 30 ms con un potencial de sostenimiento de -100mV con pulsos despolarizantes cada 10 mV hasta +50 mV a 1 Hz. Este protocolo se aplicó antes de aplicar MQ (Control), después de perfundir MQ (Mefloquina 60  $\mu$ M) y después de aplicar un lavado del fármaco son solución sin fármaco (Lavado).

En la figura 9, se muestra la relación corriente contra voltaje de ovocitos transfectados únicamente con la subunidad  $\alpha$  del canal  $Na_v$ 1.4. Para construir la relación corriente contra voltaje, se midió la magnitud de la amplitud máxima de la  $I_{Na^+}$  generada en cada paso de voltaje y se graficó en función del potencial de membrana. Como se puede observar, la MQ 60  $\mu$ M produce una inhibición del  $46 \% \pm 0.02$  en la  $I_{Na^+}$ , sin modificar el potencial de activación del canal (-40mV), ni tampoco el potencial de la amplitud máxima de la  $I_{Na^+}$  (-20 mV). Por otro lado, MQ afecta el potencial de inversión del canal con respecto al potencial del canal nativo (Control = 40 mV y MQ= 20 mV). La modificación del potencial de inversión puede ser el resultado de la saturación de cargas en el poro iónico debido a la carga positiva del fármaco. Estos efectos se redujeron al lavar el fármaco demostrando que el bloqueo del fármaco es reversible.



**Figura 9. Relación corriente contra voltaje de las subunidades  $\alpha$  de canales  $Na_v1.4$  sin subunidad  $\beta1$  expresadas en ovocitos de *Xenopus laevis*.** Se muestra la relación corriente contra voltaje de la inhibición de la  $I_{Na^+}$  por efecto de la MQ ( $60 \mu M$ ) sobre los canales  $Na_v1.4$  ( $n = 6$ ). En el inserto se muestra trazos representativos de corrientes a  $-20$  mV obtenidas de un ovocito, en condiciones control, en presencia de MQ  $60 \mu M$ , y durante el lavado. Obsérvese que MQ reduce la magnitud de la corriente y cambia el potencial de inversión del canal de  $40$  mV a  $20$  mV sin modificar el potencial de activación y el potencial de la amplitud máxima de la  $I_{Na^+}$ . Además, hay una recuperación de la corriente al lavar el fármaco después de  $20$  min.

#### 8.1.4. Inactivación de estado estable y activación de canales $Na_v1.4$ sin la subunidad $\beta1$

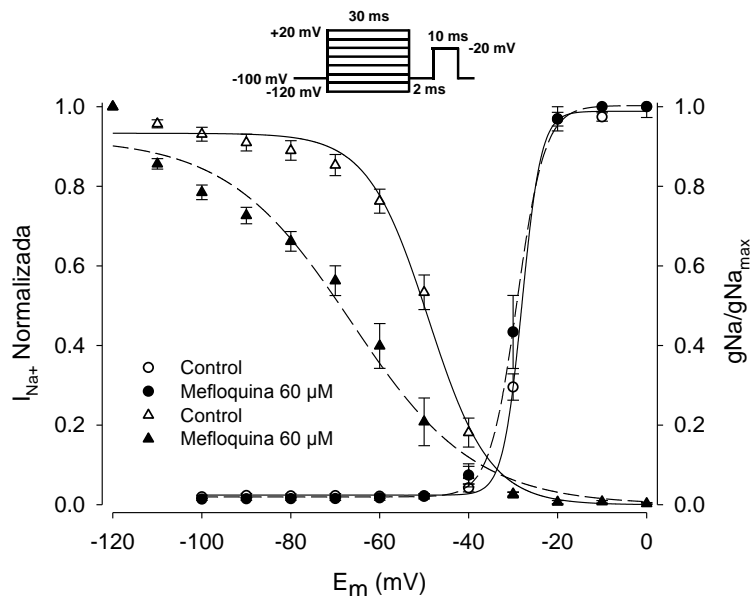
Para analizar el efecto de MQ sobre la inactivación de estado estable se empleó un protocolo convencional de doble pulso. En este protocolo se midió la magnitud del potencial de la amplitud máxima de la  $I_{Na^+}$  generada por diferentes pulsos de prueba comparándolos con el pulso condicionante y graficándolos en función de los diferentes potenciales de membrana estimulados.

Los datos normalizados fueron posteriormente ajustados mediante la ecuación de Boltzmann. La curva de la izquierda en la figura 10 muestra los resultados de la activación de estado estable antes y después de la aplicación de MQ  $60 \mu M$ . Como se puede observar en la gráfica, MQ desplaza el potencial de inactivación hacia potenciales hiperpolarizantes (control:  $V_{1/2} = -48.84 \pm 0.78$  mV;  $K = 7.06 \pm 0.68$ ; MQ  $60 \mu M$ :  $V_{1/2} = -66.27 \pm 2.45$  mV;  $K = 14.91 \pm 2.27$ ). La aplicación muestra una reducción en el potencial medio de inactivación de  $8.8$  mV ( $p < 0.001$ ).

Para calcular los valores de conductancia a diferentes potenciales y demostrar el efecto de MQ sobre este estado cinético se empleó la ecuación estándar mostrada en la sección 7.4. Los valores de la  $I_{Na^+}$  a diferentes potenciales se tomaron del estudio mostrado en la sección 8.1.

Los datos de conductancia ( $g_{Na}$ ) obtenidos y normalizados con la conductancia máxima ( $g_{Na_{max}}$ ) se graficaron en función del potencial. La curva de la derecha en la figura 10 muestra los

datos de la conductancia normalizada de canales Na<sub>v</sub>1.4 expresados en ovocitos. El ajuste de los datos mediante la ecuación de Boltzmann muestra que MQ afecta ligeramente la conductancia del canal llevándola hacia valores hiperpolarizantes sin llegar a ser significativo (control:  $V_{1/2} = -28.00 \pm 0.24$  mV;  $K = 2.14 \pm 0.23$ ; MQ 60  $\mu$ M:  $V_{1/2} = -29.06 \pm 0.19$  mV;  $K = 3.15 \pm 0.25$ ).



**Figura 10. Inactivación de estado estable y activación en canales Na<sub>v</sub>1.4 sin subunidad  $\beta$ 1.** En la gráfica se muestra el efecto de MQ 60 $\mu$ M en comparación con el control. Se muestra a la izquierda la relación de inactivación de estado estable de canales Na<sub>v</sub>1.4 expresados sin subunidad  $\beta$ 1, obtenida por medio del protocolo de doble pulso que se muestra en el inserto (parte superior media) ( $n = 6$ ). La gráfica de la derecha muestra la conductancia para la  $I_{Na+}$  obtenida a partir del estudio de la relación corriente contra voltaje ( $n = 6$ ). Los datos normalizados mostrados en ambas gráficas fueron ajustados utilizando la ecuación de Boltzmann. Nótese que MQ modifica la inactivación de estado estable de forma significativa ( $p < 0.001$ ) y afecta la conductancia ligeramente sin ser significativo su desplazamiento en relación al control desplazando la  $V_{1/2}$  hacia potenciales hiperpolarizantes.

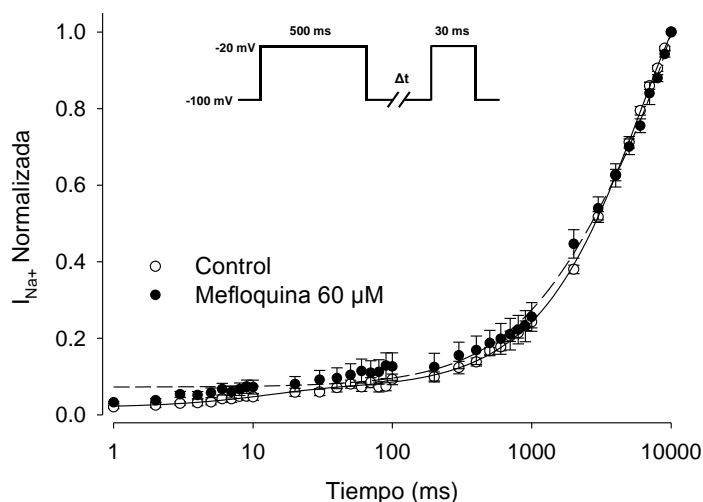
### 8.1.5. Estudio del curso temporal de la recuperación de la inactivación y la dependencia de uso en canales Na<sub>v</sub>1.4 sin subunidad $\beta$ 1

Para analizar el curso temporal de la recuperación de la inactivación de los canales Na<sub>v</sub>1.4 expresados en ovocitos sin la subunidad  $\beta$ 1, utilizamos un protocolo de estimulación de doble pulso variando el tiempo al cual se estimulaba el segundo pulso tal como se muestra en la sección de metodología. Los datos obtenidos mediante este protocolo representan la concentración de canales recuperados de la inactivación de estado estable en relación del tiempo.

En la figura 11 se muestra la fracción de canales recuperados donde el ajuste de los datos de cada célula en condiciones control mediante una ecuación de doble exponencial muestra dos

contantes de tiempo  $\tau_1 = 12.3 \pm 2.7$  ms y  $\tau_2 = 5992 \pm 131$  ms. En la misma gráfica, el ajuste de los datos de cada célula cuando se aplicó MQ mediante una exponencial simple muestra una contante de tiempo  $\tau_1 = 5284 \pm 391$  ms.

Estos resultados demuestran que MQ no afecta la fracción de canales recuperados después de la inactivación ni tampoco el tiempo de recuperación de los canales.



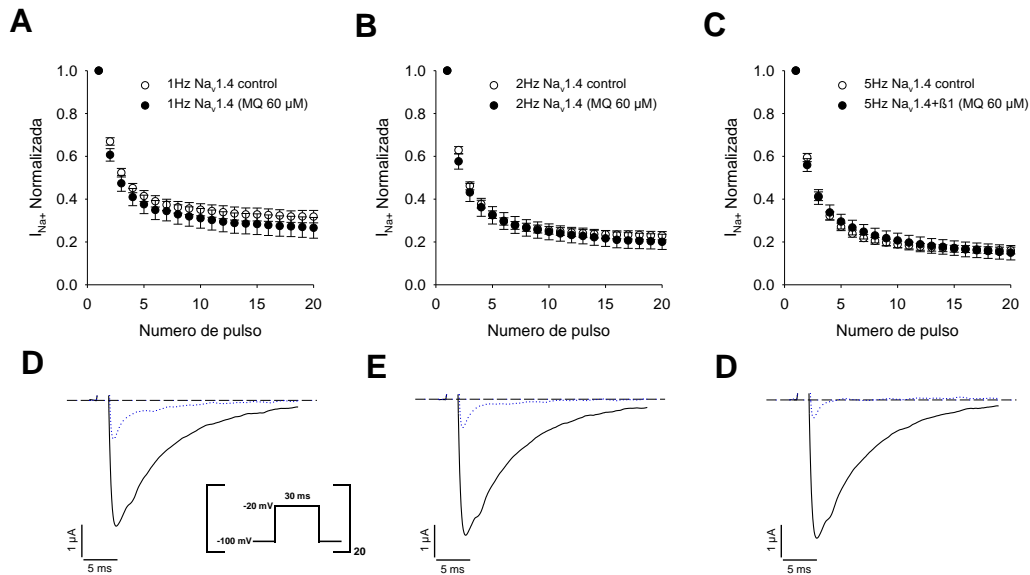
**Figura 11. Efecto de mefloquina sobre la recuperación de la inactivación en canales Nav1.4 sin subunidad  $\beta_1$ .**

Se muestra la fracción de canales Nav1.4 recuperados de la inactivación en condiciones control y en presencia de MQ 60  $\mu\text{M}$  aplicando el protocolo de estimulación mostrado en el inserto. Los datos experimentales fueron ajustados utilizando una ecuación de doble exponencial para el control (constante de tiempo  $\tau_1 = 12.3 \pm 2.7$  y  $\tau_2 = 5992 \pm 131$ ) ( $n = 6$ ) y una ecuación exponencial simple para los datos del experimento con MQ 60  $\mu\text{M}$  (constante de tiempo  $\tau_1 = 5284 \pm 391$  ms) ( $n = 6$ ). Obsérvese que MQ no modifica el tiempo de recuperación del canal Nav1.4.

Se sabe que los canales Nav1.4 sufren una acumulación de la inactivación dependiente del uso o de la frecuencia de activación. Además, se conoce que aminoquinolinas como la PQ tienen un efecto de bloqueo dependiente del uso y la frecuencia como lo demostró Orta *et al.*, (Orta, *et al.*, 2002). Por este motivo se estudió el posible efecto de bloqueo dependiente del uso de la MQ en canales Nav1.4 sin la subunidad  $\beta_1$ .

El protocolo utilizado consistió en la aplicación de trenes de estimulación a -20 mV de 20 pulsos durante 30 ms manteniendo un potencial de sostenimiento de -100 mV. El Bloqueo dependiente de la frecuencia fue entonces analizado midiendo la relación la amplitud máxima de la  $I_{\text{Na}^+}$  en cada pulso entre la amplitud máxima de la  $I_{\text{Na}^+}$  del primer pulso. Este procedimiento se repitió en frecuencias de 1, 2 y 5 Hz en condiciones control y tratado. Los resultados normalizados fueron posteriormente graficados en función del número de pulso.

Como se observa en la figura 12 se muestra que MQ no tiene un efecto de bloqueo dependiente del uso y la frecuencia en las tres diferentes frecuencias probadas.



**Figura 12. Efecto de mefloquina sobre la dependencia de uso y frecuencia en canales  $Na_v1.4$  sin subunidad  $\beta1$ .**

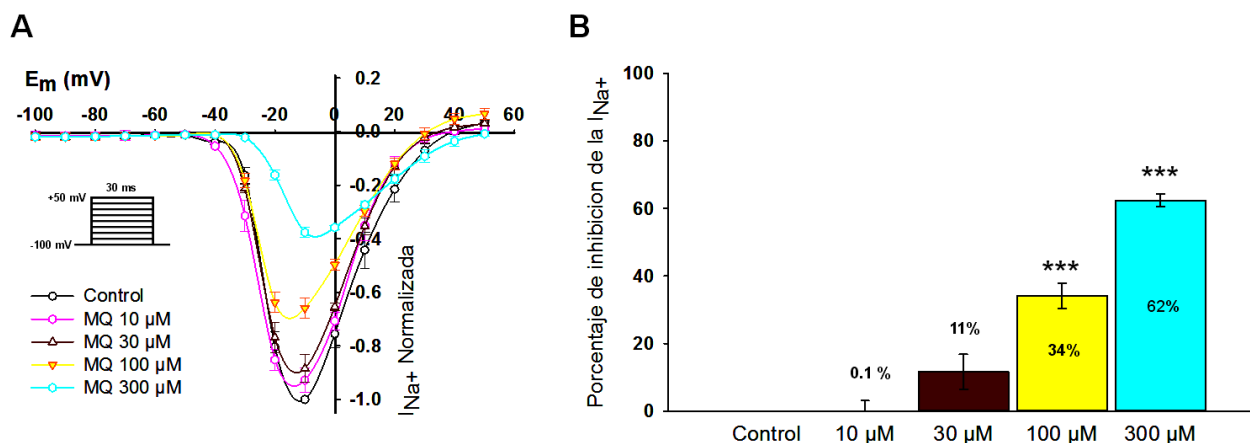
Se muestra los valores de la dependencia del uso y la frecuencia de canales  $Na_v1.4$  expresados en ovocitos de *X. laevis*. Se utilizó un protocolo de estimulación simple aplicando pulsos despolarizantes a -20 mV por 30 ms manteniendo un potencial de sostenimiento de -100 mV por 20 pulsos (ver inserto), este protocolo fue realizado a frecuencias de frecuencias de (A) 1, (B) 2 y (C) 5 Hz. Los datos normalizados fueron graficados en función del número de pulso. (D-F) muestran trazos representativos de la corriente al primer pulso (p1) y al veintavo (p20) mostrado en línea punteada. Obsérvese que en canales  $Na_v1.4$  expresados sin la subunidad  $\beta1$  no es posible establecer una dependencia del uso y la frecuencia, ya que se ha demostrado que en estas condiciones existe *per se*, una acumulación de la inactivación.

## 8.2. Efecto de mefloquina en canales coexpresados con la subunidad $\beta 1$

A continuación se muestran los resultados de experimentos realizados en canales Nav1.4 expresados en ovocitos de *Xenopus leavis*, en los cuales también se coexpresó la subunidad accesoria  $\beta 1$  de los canales de sodio.

Isom *et al.*, reportaron en 1992 que la coexpresión de subunidades  $\beta 1$  junto con las subunidades  $\alpha$  de los canales Nav tiene efectos sobre su cinética. Se ha visto que la subunidad  $\beta 1$  favorece conformaciones que permiten inactivar y recuperar a los canales de sodio más rápidamente. Se ha propuesto que el mejoramiento de la velocidad de la recuperación de la inactivación de estado estable probablemente se debe a cambios estructurales que permiten favorecer los estados de *gating* de inactivación y recuperación del canal (Isom, *et al.*, 1992; Isom, 2001). Estos cambios estructurales hacen que las propiedades farmacológicas de los canales también se modifiquen dependiendo del fármaco y del tipo de canal de sodio coexpresado (Wright *et al.*, 1997; Uebachs, *et al.*, 2010). En los canales Nav1.4 expresados en ovocitos de *Xenopus leavis* se ha observado mejor este comportamiento ya que la subunidad  $\beta 1$  afecta enormemente la cinética del canal como lo reportó Bennett *et al.*, así como también los resultados en nuestro laboratorio (Bennett, *et al.*, 1993; Sánchez-Solano, *et al.*, 2016).

En la figura 13A se muestra el efecto de la inhibición de la  $I_{Na+}$  establecida por MQ a diferentes concentraciones (10, 30, 100 y 300  $\mu\text{M}$ ) en canales Nav1.4 coexpresados con la subunidad  $\beta 1$ . En todas las concentraciones probadas se observó una inhibición de la  $I_{Na+}$  entre 0.1 a 62 % que es mucho menor en comparación del efecto observado en canales Nav1.4 sin subunidad  $\beta 1$  (Figura 13B). Esto nos indica que la presencia de la subunidad accesoria en el canal reduce la afinidad de MQ. Otros efectos que se distingue es que MQ produce el desplazamiento del potencial de activación para los canales tratados con MQ 300  $\mu\text{M}$  (Control = -40 mV; MQ 300  $\mu\text{M}$  = -50 mV) así como el cambio en el potencial de inversión cuando se aplicó MQ a 100 y 300  $\mu\text{M}$  (Control = 40 mV; MQ 100 $\mu\text{M}$  = 30 mV; MQ 300  $\mu\text{M}$  = 50 mV). También se observa que el potencial de la amplitud máxima de la  $I_{Na+}$  no se vio modificado (-10 mV para todas las concentraciones). Esto demuestra que el efecto de la inhibición de la  $I_{Na+}$  de MQ continua siendo dependiente de la concentración aun en presencia de la subunidad  $\beta 1$  pero con un menor efecto sobre la corriente.



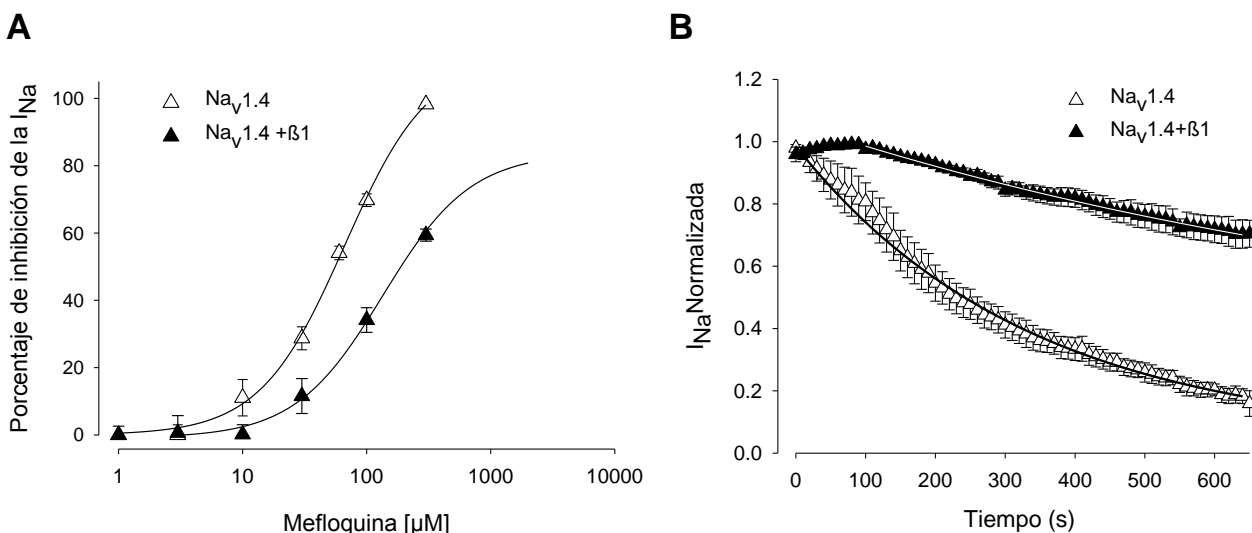
**Figura 13. Efecto de diferentes concentraciones de MQ sobre la  $I_{Na^+}$  en canales  $Na_v1.4$  coexpresados con la subunidad  $\beta1$ .** En (A) se muestra la relación corriente contra voltaje en presencia de diferentes concentraciones de MQ (10, 30, 100 y 300  $\mu M$ ) ( $n = 6$ ). En (B) se muestra el porcentaje de inhibición de la  $I_{Na^+}$  a diferentes concentraciones de MQ (30, 60, 100 y 300  $\mu M$ ) (\*\* $p < 0.001$ ). Se puede observar la dependencia de la concentración en el efecto que tiene MQ sobre las corrientes iónicas a diferentes potenciales. También la variación de los potenciales de activación, inversión de la corriente a concentraciones mayores de 100  $\mu M$  de MQ.

### 8.2.1. Concentración inhibitoria media de canales $Na_v1.4$ coexpresados con la subunidad $\beta1$

En canales  $Na_v1.4$  coexpresados con la subunidad  $\beta1$  ( $Na_v1.4 + \beta1$ ) la concentración inhibitoria media (*half maximal inhibitory concentration*-  $IC_{50}$ ) de MQ calculada con la ecuación de Hill muestra un valor  $IC_{50} = 128.13 \mu M$  y un número de Hill de  $1.07 \pm 0.8$ . Tomando en consideración este valor los posteriores resultados serán referentes a la concentración más próxima a la  $IC_{50}$  que es 100  $\mu M$  (Figura 14A).

En la figura 14B se muestra el curso temporal del efecto de MQ a una concentración de 100  $\mu M$  (MQ a 100  $\mu M$ ). En canales  $Na_v1.4$  coexpresados con la subunidad  $\beta1$  ( $Na_v1.4 + \beta1$ ) la MQ produce una inhibición de la  $I_{Na^+}$  de un  $34 \% \pm 3.6$  comparada con el  $73 \% \pm 2.4$  de inhibición de la  $I_{Na^+}$  en canales expresados sin la subunidad  $\beta1$  ( $Na_v1.4$ ). Al realizar un ajuste de los datos a una ecuación exponencial simple se observa que los valores de  $\tau_{ON}$  fueron  $316.5 \pm 11$  s para  $Na_v1.4$  y  $980 \pm 112$  s para  $Na_v1.4 + \beta1$ , mostrando una reducción de la inhibición de la  $I_{Na^+}$  significativa ( $p < 0.001$ ;  $n = 6$ ).

Estos resultados demuestran que los canales de sodio  $Na_v1.4$  coexpresados con la subunidad  $\beta1$  ( $Na_v1.4 + \beta1$ ) son menos sensibles al efecto de la inhibición de la  $I_{Na^+}$  por MQ.



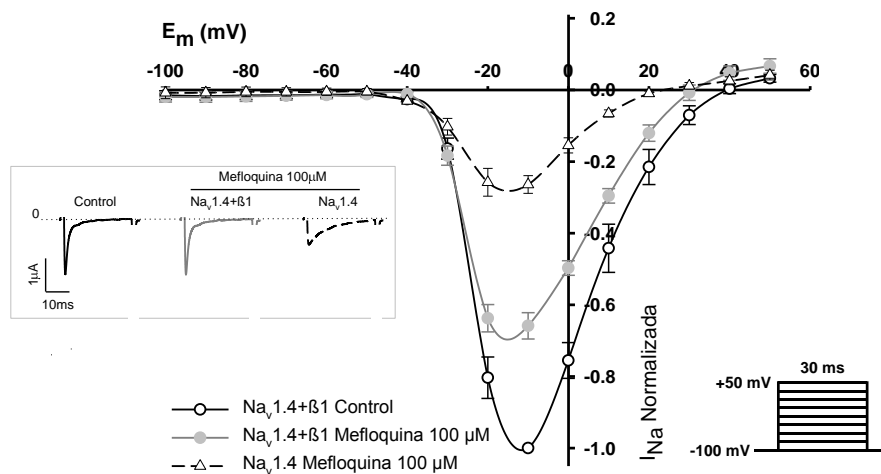
**Figura 14. Efecto de mefloquina en presencia y ausencia de la subunidad  $\beta 1$  sobre las  $I_{Na^+}$  de  $Na_v1.4$ .** En (A) se muestran las curvas de concentración-efecto utilizando concentraciones de 1, 3, 10, 30, 60, 100 y 300  $\mu M$  ( $n = 6$ ). El ajuste de los datos mediante una ecuación de Hill muestra que la  $IC_{50}$  de  $Na_v1.4 + \beta 1$  es de 128.13  $\mu M$  y un número de Hill de  $1.07 \pm 0.8$  esta concentración es mayor a la  $IC_{50}$  calculada para los canales  $Na_v1.4$  sin la subunidad  $\beta 1$ . En (B) se observa el curso temporal del efecto de MQ 100  $\mu M$  en canales  $Na_v1.4$  expresados con y sin la subunidad  $\beta 1$  en ovocitos de *Xenopus laevis*. Los datos fueron ajustados a una ecuación exponencial simple mostrando una  $\tau_{ON}$  de  $316.5 \pm 11$  s para  $Na_v1.4$  y  $980 \pm 112$  s para  $Na_v1.4 + \beta 1$  ( $n = 6$ ). El análisis estadístico muestra que existe una marcada reducción de la potencia de MQ ya que se incrementó la  $\tau_{ON}$  de curso temporal y la  $IC_{50}$  ( $p < 0.001$ ,  $n = 6$ ).

### 8.2.2. Relación corriente contra voltaje de canales $Na_v1.4$ expresados con la subunidad $\beta 1$

En la figura 15, se muestra la relación corriente contra voltaje de ovocitos cotransfectados con la subunidad  $\alpha$  y  $\beta 1$  del canal  $Na_v1.4$  y a los que se les aplicó MQ 100  $\mu M$ . Como se puede observar MQ produce una inhibición del  $34 \% \pm 3.6$  en la  $I_{Na^+}$ , sin modificar el potencial de activación del canal que fue a  $-40 mV$ , ni tampoco el potencial de la amplitud máxima de la de la  $I_{Na^+} = -10 mV$ . Esto muestra una diferencia significativa en relación a la inhibición descrita para canales  $Na_v1.4$  sin la presencia de la subunidad  $\beta 1$  donde la inhibición de la  $I_{Na^+}$  con MQ 100  $\mu M$  fue de  $73 \% \pm 2.4$ .

Por otro lado, la presencia de la subunidad  $\beta 1$  reduce el efecto que MQ tiene sobre el potencial de inversión del canal con respecto al potencial del canal nativo (Control = 40 mV y MQ = 30 mV). La modificación del potencial de inversión puede ser el resultado de la saturación de cargas en el poro iónico debido a la carga positiva del fármaco y su reducción se sugiere que esté relacionada con un impedimento estérico producido por el dominio globular de la subunidad  $\beta 1$ . En estos experimentos no se pudo completar la etapa de lavado debido a la susceptibilidad de los

ovocitos. La causa de este fenómeno es la intoxicación por el acumulo del fármaco en proteínas intracelulares que producen desestabilización de los componentes intracelulares (Zidovetzki et al., 1990; Achieng et al., 2017). Debido a esto no se pudo mostrar la reversibilidad de la fijación en los canales Na<sub>v</sub>1.4 coexpresados con la subunidad β1



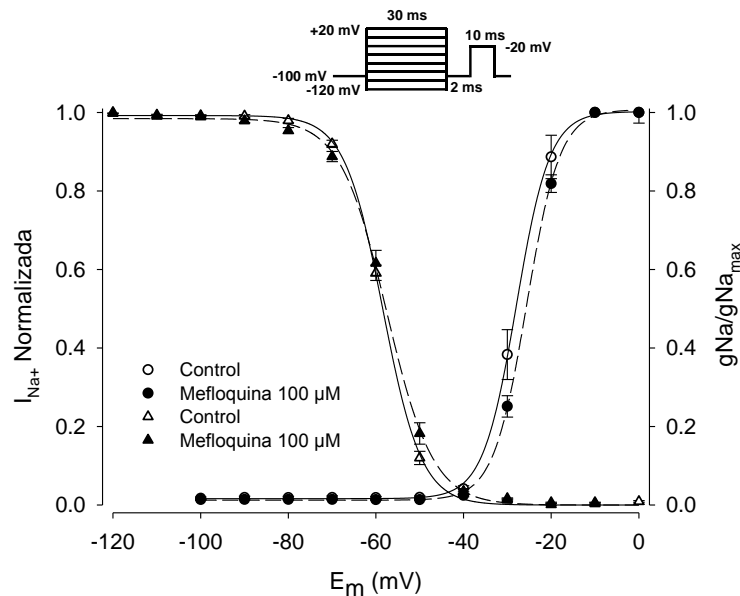
**Figura 15. Relación corriente contra voltaje de los canales Na<sub>v</sub>1.4 coexpresados con la subunidad β1 en ovocitos de *X. laevis*.** En la gráfica se muestra la relación corriente contra voltaje en presencia de MQ 100 μM sobre los canales Na<sub>v</sub>1.4 coexpresados junto con la subunidad β1 (Na<sub>v</sub>1.4+β1), comparados con el efecto producido en canales sin la subunidad β1 (Na<sub>v</sub>1.4) de la misma concentración. En el inserto de la izquierda se muestran trazos representativos de la corriente cruda. Y en el inserto de la derecha el protocolo de estimulación aplicado. Note que la MQ (100 μM) Inhibe de la I<sub>Na+</sub> y cambia el potencial de inversión de 30 a 50 mV.

### 8.2.3. Inactivación de estado estable y activación de canales Na<sub>v</sub>1.4 coexpresados con la subunidad β1

En la figura 16 se muestra el análisis del efecto de MQ (100 μM) sobre la inactivación de estado estable en canales Na<sub>v</sub>1.4 coexpresados junto con la subunidad β1 en ovocitos de *X. laevis*. Los datos normalizados y ajustados con la ecuación de Boltzmann resultaron en una V<sub>1/2</sub> para condiciones control de  $-58.47 \pm 0.1$  mV; K=  $-4.29 \pm 0.10$  y para los canales a los que se aplicó MQ 100μM fue de  $-57.54 \pm 0.18$ ; K=  $-5.28 \pm 0.16$ . El análisis estadístico muestra una diferencia significativa  $p < 0.001$  en relación al control. En la misma figura 16, pero en la curva de la derecha se muestra la conductancia de los canales Na<sub>v</sub>1.4 coexpresados junto con la subunidad β1. El ajuste de los datos con la ecuación de Boltzmann establece que el

en condiciones control el  $V_{1/2} = -27.90 \pm 16.22$ ;  $K=3.82 \pm 0.14$  y para los canales a los que se aplicó MQ 100  $\mu\text{M}$  el  $V_{1/2} = -25.45 \pm 0.10$  mV:  $K=3.85 \pm 0.07$ , resultaron también diferentes con un nivel de significancia con una  $p < 0.01$  en relación al control.

Estos resultados demuestran que en presencia de la subunidad  $\beta_1$ , existe un ligero cambio de los potenciales de activación e inactivación hacia potenciales más despolarizantes, resultado contrario al visto en canales Nav1.4 sin la subunidad accesoria. Este hallazgo puede sustentarse en el hecho de que en los canales Nav1.4 existe un rearrreglo estructural producido por la subunidad  $\beta_1$ . Ya que, se ha reportado que esta subunidad favorece estados conformacionales que favorecen la aceleración de la inactivación y la recuperación; y modifican la dependencia del voltaje de inactivación afectando también la afinidad de los fármacos por el canal (Wright *et al.*, 1997; Uebachs, *et al.*, 2010; Brackenbury e Isom, 1999 y 2011). Tomando en consideración lo anterior, la disminución del efecto de MQ sobre el potencial de inactivación del canal y el cambio visto en el potencial de activación pueden ser el producto de estos cambios estructurales sobre el sitio de interacción de MQ.



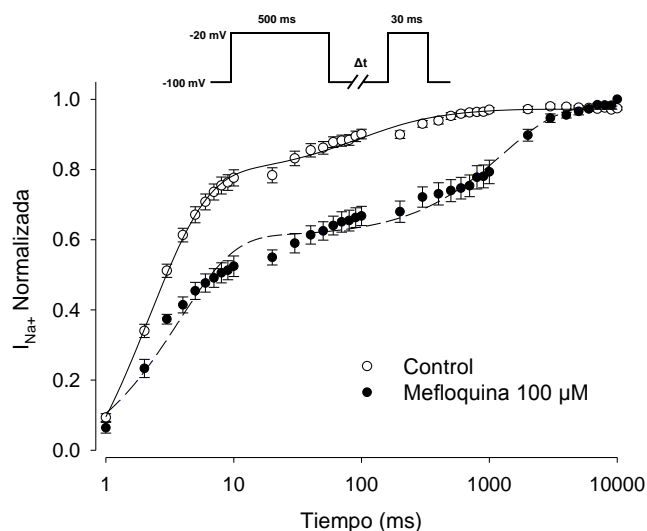
**Figura 16. Inactivación de estado estable y activación en canales Nav1.4 coexpresados con la subunidad  $\beta_1$ .** En la gráfica se muestra el efecto de MQ 100  $\mu\text{M}$  en comparación con el control. A la izquierda se muestra la relación de inactivación de estado estable de los canales, obtenida por medio del protocolo de doble pulso que se muestra en el inserto (parte superior media) ( $n = 6$ ). La gráfica de la derecha muestra la conductancia de los canales obtenida a partir del estudio de la relación corriente contra voltaje ( $n = 6$ ). Los datos normalizados mostrados en ambas gráficas fueron ajustados utilizando la ecuación de Boltzmann. Nótese que MQ modifica la inactivación de estado estable de forma significativa ( $p < 0.001$ ) y afecta la conductancia ligeramente sin ser significativo su desplazamiento en relación al control ( $p < 0.01$ ), desplazando su  $V_{1/2}$  hacia potenciales más despolarizantes.

### 8.2.4. Estudio del curso temporal de la recuperación de la inactivación y dependencia del uso de canales Na<sub>v</sub>1.4 coexpresados con la subunidad β1

Para analizar el curso temporal de la recuperación de la inactivación del canal Na<sub>v</sub>1.4 coexpresado con la subunidad β1, donde se utilizó un protocolo de estimulación de doble pulso variando el tiempo al cual se daba el segundo pulso tal como se muestra en la sección de metodología.

En la figura 17 se muestran la fracción de canales recuperados en condiciones control y aplicando MQ 100 μM. El ajuste de los datos de cada célula en condiciones control mediante una ecuación de doble exponencial muestra dos constantes de tiempo  $\tau_1 = 1.47 \pm 0.13$  ms y  $\tau_2 = 79.40 \pm 12.67$  ms. En la misma gráfica, el ajuste de los datos de cada célula cuando se aplicó MQ 100 μM mediante una ecuación de doble exponencial muestra dos constantes de tiempo  $\tau_1 = 3.70 \pm 0.31$  ms y  $\tau_2 = 1272.15 \pm 137.67$  ms.

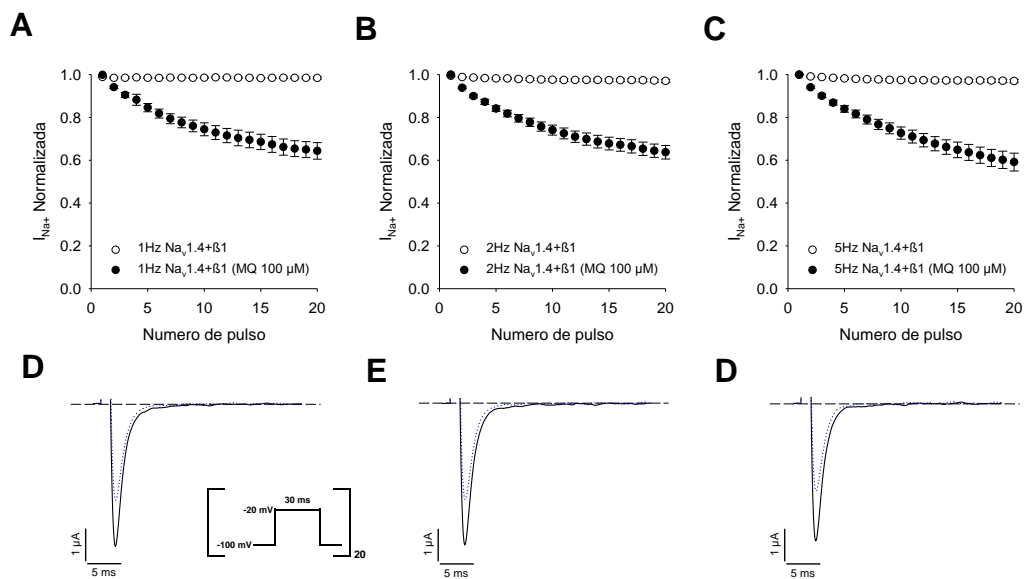
El análisis estadístico muestra que MQ en canales Na<sub>v</sub>1.4 coexpresados con la subunidad β1 enlentece la recuperación de los canales tanto en su componente lenta como en la rápida de manera significativa ( $p < 0.001$ ).



**Figura 17. Efecto de mefloquina sobre la recuperación de la inactivación en canales Na<sub>v</sub>1.4 coexpresados con la subunidad β1.** Se muestra la fracción de canales Na<sub>v</sub>1.4 coexpresados con la subunidad β1 recuperados de la inactivación en condiciones control y en presencia de MQ 100 μM. Para la construcción de la gráfica se aplicó el protocolo de estimulación mostrado en el inserto. Los datos experimentales fueron ajustados utilizando una ecuación de doble exponencial para el control y los tratados con MQ, mostrando dos constantes de tiempo. Para el control fueron  $\tau_1 = 1.47 \pm 0.13$  ms y  $\tau_2 = 79.40 \pm 12.67$  ms ( $n = 6$ ); y para el grupo tratado con MQ 100 μM fueron  $\tau_1 = 3.70 \pm 0.31$  ms y  $\tau_2 = 1272.15 \pm 137.67$  ms ( $n = 6$ ). Nótese que MQ en canales Na<sub>v</sub>1.4 coexpresados con la subunidad β1 reduce la fracción de canales recuperados de la inactivación y modifica las constantes de tiempo de manera significativa.

Se sabe que la subunidad  $\beta 1$  reduce la acumulación de la inactivación que sufren los canales  $\text{Na}_v 1.4$  por el efecto favorable que tiene sobre los estados de inactivación y recuperación del canal (Wright *et al.*, 1997; Uebachs, *et al.*, 2010; Brackenbury y Isom, 1999 y 2011).

Al determinar si MQ 100  $\mu\text{M}$  presenta un bloqueo dependiente del uso y la frecuencia en canales  $\text{Na}_v 1.4$  coexpresados junto con la subunidad accesoria  $\beta 1$ , se aprecia que MQ favorece una reducción de la  $I_{\text{Na}^+}$  de los canales frente a despolarizaciones repetidas a 1, 2 y 5 Hz como se observa en la figura 18. Esta disminución de la corriente no es proporcionalmente significativa entre las diferentes frecuencias probadas. Sin embargo, si encontraron diferencias significativas cuando comparó el efecto de la reducción de la  $I_{\text{Na}^+}$  contra el control en cada frecuencia ( $I_{\text{Na}^+}$  Normalizada al pulso 20 a 1 Hz Control =  $0.98 \pm 0.00$ , MQ 100  $\mu\text{M}$  =  $0.64 \pm 0.3$  (Paneles A y D);  $I_{\text{Na}^+}$  Normalizada al pulso 20 a 2 Hz Control =  $0.97 \pm 0.00$ , MQ 100  $\mu\text{M}$  =  $0.63 \pm 0.03$  (Paneles B y E) y  $I_{\text{Na}^+}$  Normalizada al pulso 20 a 5 Hz Control =  $0.97 \pm 0.00$ , MQ 100  $\mu\text{M}$  =  $0.59 \pm 0.04$ ) (Paneles C y D).



**Figura 18. Efecto de mefloquina sobre la dependencia de uso y frecuencia en canales  $\text{Na}_v 1.4$  coexpresado con la subunidad  $\beta 1$ .** Se muestran los valores de la dependencia del uso y la frecuencia de canales  $\text{Na}_v 1.4$  expresados en ovocitos de *X. laevis* junto con la subunidad  $\beta 1$ . Aplicando el protocolo mostrado en el inserto, el cual fue realizado a diferentes frecuencias, por último los datos normalizados fueron graficados en función del número de pulsos. Se observa en (A) 1 Hz donde los valores de la  $I_{\text{Na}^+}$  Normalizada al p20 fueron Control =  $0.98 \pm 0.00$ , MQ 100  $\mu\text{M}$  =  $0.64 \pm 0.3$ ; en (B) 2 Hz donde los valores de la  $I_{\text{Na}^+}$  Normalizada al p20 fueron Control =  $0.97 \pm 0.00$ , MQ 100  $\mu\text{M}$  =  $0.63 \pm 0.03$ ; y en (C) 5 Hz donde los valores de la  $I_{\text{Na}^+}$  Normalizada al p20 fueron Control =  $0.97 \pm 0.00$ , MQ 100  $\mu\text{M}$  =  $0.59 \pm 0.04$ . En (D, E y F) se muestran trazos representativos de la corriente al primer pulso (p1) y el veintavo (p20) marcado en línea punteada. Obsérvese que MQ tiene un bloqueo dependiente del uso y la frecuencia en canales  $\text{Na}_v 1.4$  coexpresados con la subunidad  $\beta 1$  que no es significativo entre las diferentes frecuencias probadas, pero sí con respecto de cada control ( $p < 0.001$  prueba de ANOVA seguida de Tukey's  $n = 5$ ).

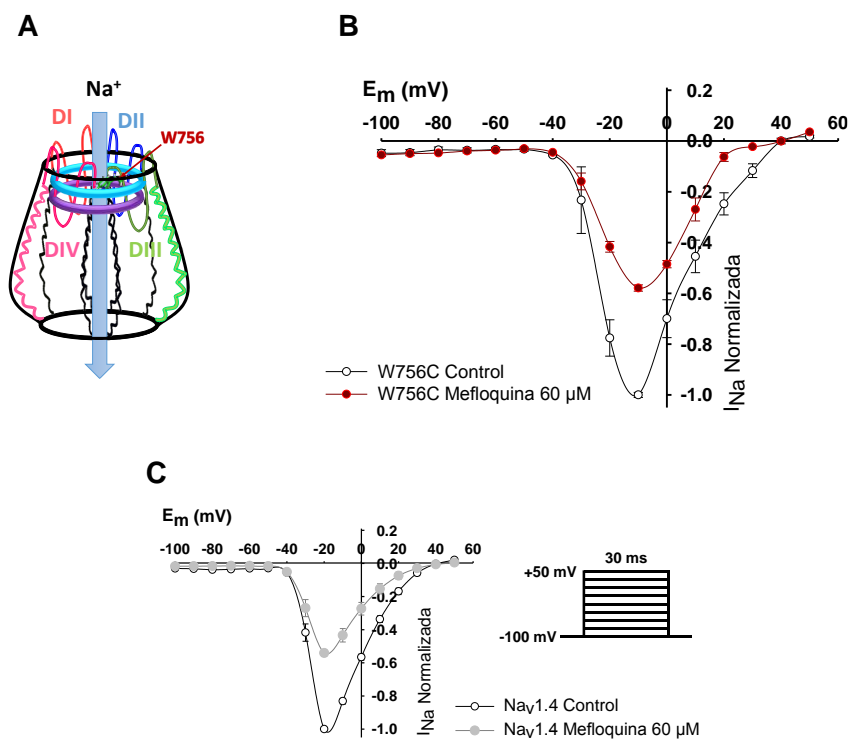
### 8.3. Estudios del efecto de mefloquina en mutantes Na<sub>v</sub> 1.4 sin subunidad β1

Después de haber establecido las propiedades cinéticas de los canales Na<sub>v</sub>1.4 sin y con la subunidad β1 expresados en ovocitos, nuestro interés se enfocó en investigar el sitio de interacción de MQ. Para la búsqueda diseñamos mutaciones sitio dirigidas apoyadas en gran medida de los resultados de experimentos *in silico* explicados en la Sección 8.4.3. A continuación se describen los objetivos de las mutaciones estudiadas y los resultados obtenidos.

#### 8.3.1. Mutación de triptófano a cisteína (W756C)

El primer sitio que probado se trata de un triptófano localizado en la posición 756 (W756) localizado en la boca externa del canal por encima del motivo DEKA, (Figura 19A), que corresponde al sitio de interacción reportado para PQ por Salinas-Stefanon *et al.* (Salinas-Stefanon *et al.*, 2011). En este experimento se realizó la mutación a cisteína de este aminoácido (W756C).

Los canales mutados fueron microinyectados en ovocitos y analizados mediante estudios electrofisiológicos. En la figura 19B se presentan los datos de corriente contra voltaje de 7 células, en donde se puede observar que la mutación W756C no tiene efecto sobre la inhibición de la I<sub>Na+</sub> con MQ 60 μM. Los resultados muestran una inhibición de la I<sub>Na+</sub> del 42 % ± 0.01 en comparación con el control la cual no muestra diferencias significativas en relación a la inhibición mostrada en los canales nativos (46 % ± 0.02) (Figura 19C). Este resultado sugiere que MQ no tiene el mismo sitio de interacción que PQ en el anillo de triptófanos localizado en el labio externo del canal.



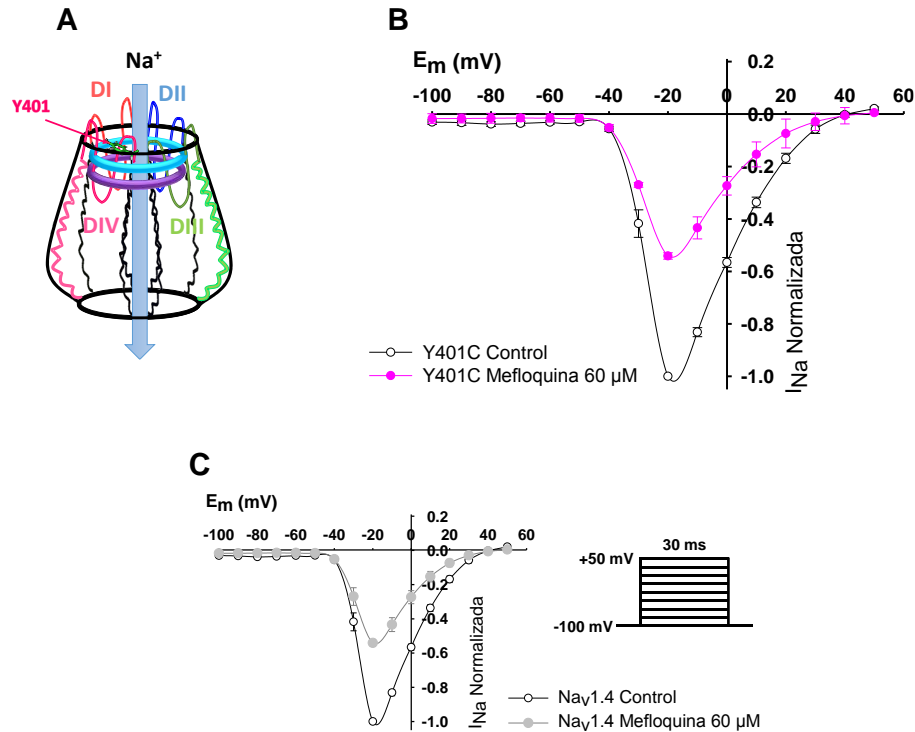
**Figura 19. Efecto de MQ sobre la corriente en canales mutados W756C.** En **(A)** Se observa una representación esquemática de la localización del aminoácido W756 en el canal mutado. En **(B)** Se muestra la relación corriente contra voltaje de la mutante W756C del anillo de triptófanos presente sobre el motivo DEKA del canal Nav1.4 en condiciones control y en presencia de MQ 60 μM (n = 7). En **(C)** se muestra la relación corriente contra voltaje de canales Nav1.4 nativos. Para la construcción de estas graficas se utilizó el protocolo mostrado en el inserto. Obsérvese que en los canales mutados W756C la MQ 60 μM reduce la I<sub>Na+</sub> un 42% ± 0.01 sin ser significativamente diferente a la inhibición de los canales nativos.

### 8.3.2. Mutación de tirosina por cisteína (Y401C)

A pesar de los resultados obtenidos con la mutante W756C, los estudios de acoplamiento molecular (*docking*) continuaban arrojando resultados de acoplamiento localizados en la boca externa del canal sobre otros aminoácidos de importancia biológica (ver Sección 8.4.3). Así que se decidió probar la mutación de una tirosina en la posición 401 por cisteína (Y401C) para establecer si MQ podría tener el mismo sitio que otros compuestos como la tetrodotoxina (TTX) o saxitoxina (STX) (Figura 20A). Ya que se ha demostrado que esta mutante tiene un efecto directo sobre la afinidad de estas toxinas en los canales de sodio como lo han descrito diferentes autores (Terlau *et al.*, 1991; Stephan *et al.*, 1994; Sunami *et al.*, 2000; Fozzard y Lipkind, 2010).

En la figura 20 se muestran los resultados de los estudios electrofisiológicos realizados en canales mutados Y401C expresados en ovocitos de *X. laevis*. Como se aprecia, los canales mutados

muestran una inhibición de la  $I_{Na+}$  después de la aplicación de MQ 60  $\mu\text{M}$  del 45 %  $\pm$  2.0. Al comparar esta inhibición de la  $I_{Na+}$  con la de canales nativos (Inhibición = 46 %  $\pm$  0.02) no presentó diferencia significativa. Lo cual apunta a que MQ no posee el mismo sitio reportado para las toxinas TTX y STX en la boca externa del canal.



**Figura 20. Efecto de MQ sobre la corriente en canales mutados Y401C.** En (A) Se observa una representación esquemática de la localización del aminoácido Y401 en el canal mutado. En (B) Se muestra la relación corriente contra voltaje de la mutante Y401C del sitio de unión de la TTX sobre el motivo DEKA del canal  $\text{Nav}_1.4$  en condiciones control y en presencia de MQ 60  $\mu\text{M}$  ( $n = 4$ ). En (C) se muestra la relación corriente contra voltaje de canales  $\text{Nav}_1.4$  nativos. Para la construcción de estas graficas se utilizó el protocolo mostrado en el inserto. Obsérvese que en los canales mutados Y401C la MQ 60  $\mu\text{M}$  reduce la  $I_{Na+}$  un 45 %  $\pm$  2.0 sin ser significativamente diferente a la inhibición de los canales nativos.

### 8.3.3. Mutaciones de la lisina del motivo DEKA por alanina (K1237A) y por cisteína (K1237C)

Continuando la búsqueda del sitio de interacción en el vestíbulo externo, se probó un tercer aminoácido que había tenido posiciones estructurales favorables en las simulaciones computacionales, así mismo, Salinas *et al.* en 2011 mostraron que este aminoácido tenía una ligera influencia sobre la afinidad de PQ por los canales  $\text{Nav}_1.4$  (Salinas-Stefanon *et al.*, 2011). Este aminoácido es la lisina localizada en la posición 1237 (K1237) del motivo DEKA la cual, fue mutada a alanina (K1237A) y a cisteína (K1237C).

En este caso, la sola mutación K1237C muestra efectos interesantes sobre la cinética del canal como el potencial de activación, el de la amplitud máxima de la  $I_{Na+}$  ni el potencial de inversión de los canales. Al comparar los canales nativos Nav1.4 y los canales mutados K1237C se observa un desplazamiento de potenciales los potenciales hacia valores más hiperpolarizantes (Potencial de activación: Nav1.4 nativos = -40 mV; K1237C = -50 mV. Potencial de la amplitud máxima de la de  $I_{Na+}$ : Nav1.4 nativos = -20 mV; K1237C = -30 mV. Potencial de inversión: Nav1.4 = 40 mV; K1237C = 5mV) (Figura 21A). Según Martínez-Morales en 2011 estos cambios se deben al efecto que tiene K1237 sobre la estabilidad de estados transitorios de activación e inactivación del canal.

Como también lo muestra la figura 21A la perfusión de MQ en los canales K1237C altera los potenciales de activación y el potencial de la amplitud máxima de la  $I_{Na+}$  (Potencial de activación de los canales: K1237C = -50 mV; MQ 60  $\mu$ M = -40 mV. Potencial de la amplitud máxima de la  $I_{Na+}$ : K1237C = -30 mV; MQ 60  $\mu$ M = -20 mV), y del potencial de inversión hacia potenciales hiperpolarizantes (K1237C = -50 mV; MQ 60  $\mu$ M = 0). Hay que remarcar que en contraste el efecto de MQ 60  $\mu$ M en canales nativos Nav1.4 sin subunidad  $\beta$ 1 la mutación K1237C aumenta el efecto de la inhibición de la  $I_{Na+}$  un 10 % ( $p < 0.001$   $n = 7$ ).

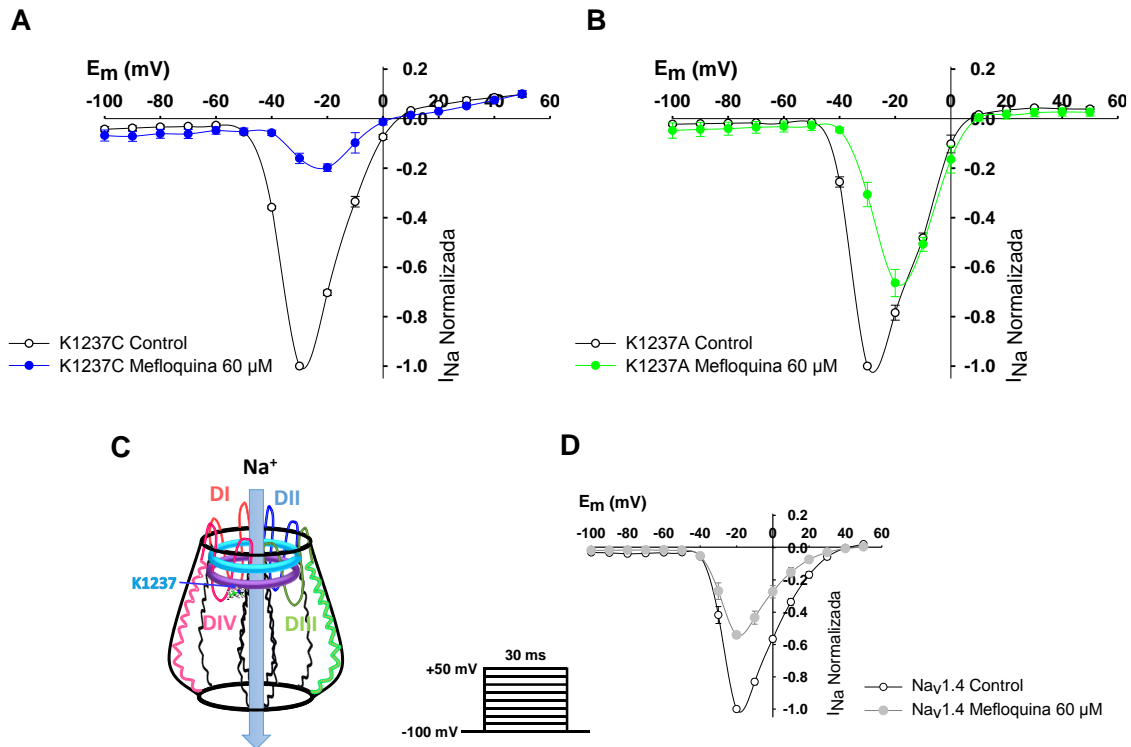
Dado que la mutación de K1237C cambia la estructura de la boca externa lo cual se observa en el cambio de las propiedades cinéticas de canal se probó una mutación de lisina en la posición 1237 a alanina (K1237A) que tiene un efecto menos drástico sobre el canal Nav1.4, dado que es un aminoácido con volumen pequeño, sin carga ni polaridad según lo reportado por Martínez-Morales en 2011 y Sanchez-Solano en 2016.

La figura 21B nos permite observar que aunque existen cambios cinéticos debidos a la mutación a alanina (K1237A), estos son menos severos que los producidos por la mutación a cisteína (K1237C). La mutante K137A altera los potenciales de activación y del potencial de la amplitud máxima de la  $I_{Na+}$  del canal hacia valores más hiperpolarizantes (Potencial de activación de los canales: Nav1.4 = -40 mV; K1237A = -50 mV. Potencial de la amplitud máxima de la  $I_{Na+}$ : Nav1.4 = -20 mV; K1237A = -30 mV. Potencial de inversión: Nav1.4 = 40 mV; K1237A = 10mV).

En la misma, también se muestran los resultados del efecto de MQ 60  $\mu$ M en canales mutados K1237A. En cuanto la cinética del canal, se observa un desplazamiento del potencial de activación y del potencial de la amplitud máxima de la  $I_{Na+}$  hacia potenciales más despolarizantes mientras que no se observa un cambio en el potencial de inversión en comparación con los canales K1237A sin fármaco (Potencial de activación de los canales: K1237C = -50 mV; MQ 60  $\mu$ M = -40 mV. Potencial de

la amplitud máxima de la  $I_{Na+}$ : K1237C = -30 mV; MQ 60  $\mu$ M = -20 mV. Potencial de inversión: K1237A = 10 mV; MQ 60  $\mu$ M = 10 mV). En estos canales la inhibición de la  $I_{Na+}$  fue de 34 %  $\pm$  4.2 en comparación al grupo control (Nav1.4 = 46 %  $\pm$  0.02) mostrando una disminución ligera de la afinidad de MQ por el canal ( $p < 0.05$  n = 4).

Estos resultados permiten establecer que si bien la lisina en la posición 1237 participa en la interacción de MQ parece no ser vital para la afinidad. Y que posiblemente al aumento de hidropatía que produce K1237C mejora la afinidad de MQ por el canal.

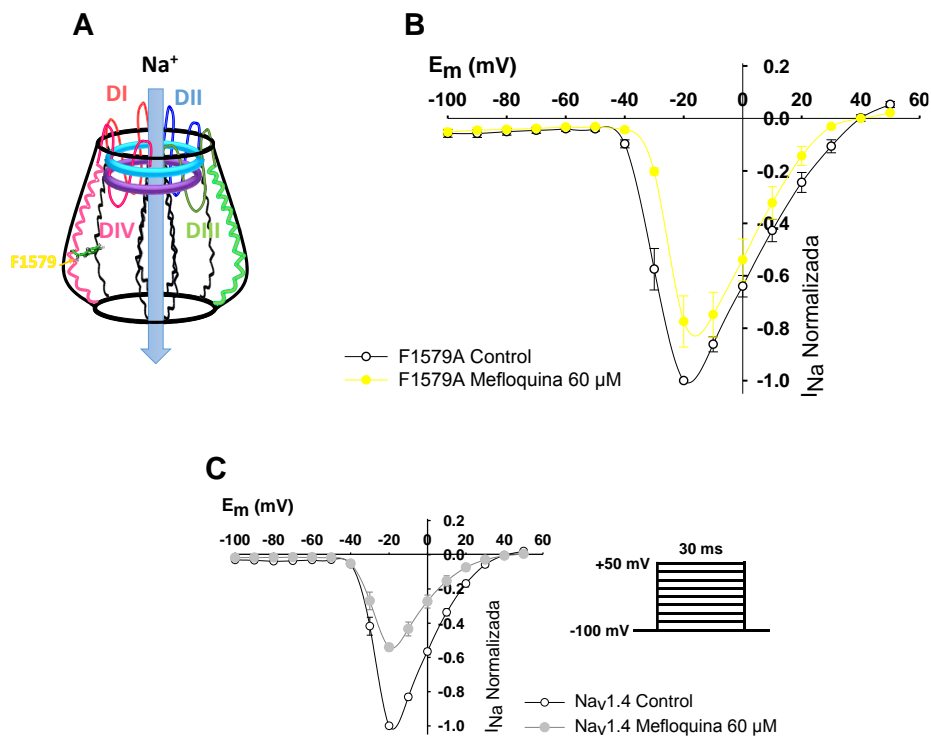


**Figura 21. Efecto de MQ sobre la corriente en canales mutados K1237C y K1237A.** Se muestra la relación corriente contra voltaje de diferentes canales mutados probados. Para la construcción de estas graficas se utilizó un protocolo de estimulación de 30 ms con un potencial de sostenimiento de -100mV con pulsos despolarizantes cada 10mV hasta +50mV a 1Hz (mostrado en el inserto). En **(A)** se muestra la curva de la relación corriente contra voltaje de la mutación K1237C del motivo DEKA del canal (n = 7). En **(B)** se muestra la curva de la relación corriente contra voltaje de la mutación K1237A del motivo DEKA del canal (n = 4). En **(C)** se observa una representación esquemática de la localización del aminoácido K1237 en el canal mutado. En **(D)** se muestra la relación corriente contra voltaje de canales Nav1.4 nativos. Nótese que las dos mutantes se comportan cinéticamente diferente y que en el caso de la mutación K1237C permite mejorar la afinidad del fármaco aumentando el bloqueo de la  $I_{Na+}$  y en el caso de la mutante K137A reduce ligeramente la afinidad y el efecto de bloqueo de la  $I_{Na+}$  significativamente ( $p < 0.05$ ).

### 8.3.4. Efecto de mefloquina en el sitio de unión a anestésicos locales F1579

El nuevo modelo del canal  $Na_v1.4$  desarrollado a partir de la subunidad  $\alpha$  del canal  $Na_v$  de *Arcobacter butzleri* (ID 4EKW), permitió observar que MQ también podía interactuar dentro del canal en el sitio de unión a anestésicos locales reportado previamente por Lipkind y Fozzard en 2005. Por tal motivo, este fue el siguiente sitio a estudiar donde se realizó la sustitución de la fenilalanina en la posición 1579 a alanina (F1579A), debido a que se ha demostrado que este aminoácido es fundamental para la unión al canal de diferentes anestésicos locales tales como lidocaína y benzocaína en el vestíbulo interno (Lipkind y Fozzard, 2005; Fozzard et al., 2011).

En la figura 22 se muestra el efecto que tiene la aplicación de MQ 60  $\mu M$  sobre las corrientes de los canales mutados F1579A. Se puede notar que la afinidad de MQ disminuye drásticamente reduciendo el bloqueo de la  $I_{Na+}$  a tan sólo el 9.5 %  $\pm$  5.2 en comparación del 45.9 %  $\pm$  2.0 del bloqueo que presentan los canales  $Na_v1.4$  nativos. Así mismo, el potencial de activación no se altera, pero si los potenciales del potencial de la amplitud máxima de la  $I_{Na+}$  y el de inversión.

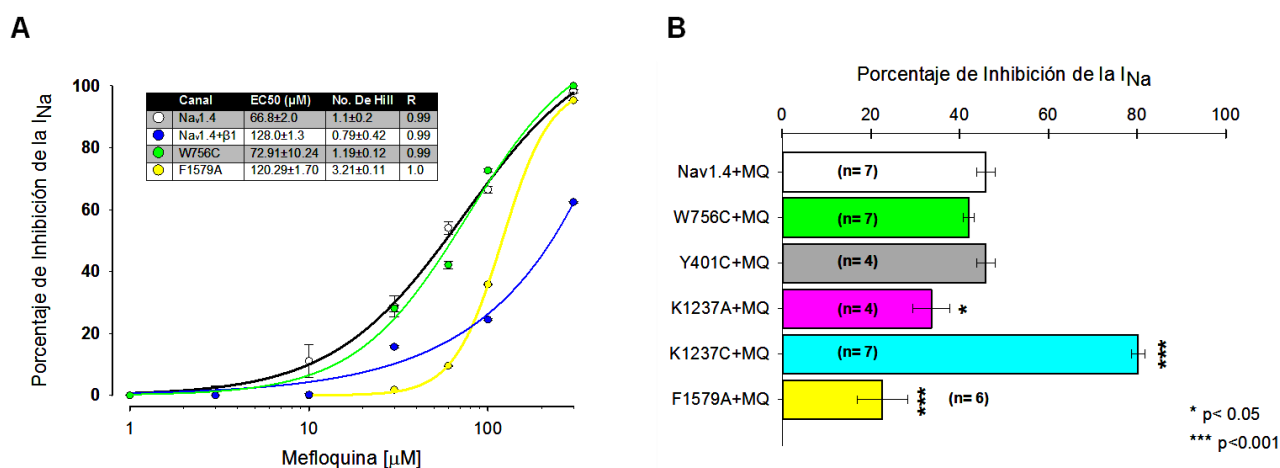


**Figura 22. Efecto de MQ sobre la  $I_{Na+}$  en canales mutados F1579A.** Se muestra la relación corriente contra voltaje de diferentes canales mutados probados. Para la construcción de estas graficas se utilizó un protocolo de estimulación de 30 ms con un potencial de sostenimiento de -100mV con pulsos despolarizantes cada 10mV hasta +50mV a 1Hz (mostrado en el inserto). En (A) se observa una representación esquemática de la localización del aminoácido F1579 en el canal mutado. Se (B) muestra la relación corriente contra voltaje de la mutación

F1579A del sitio de unión a anestésicos locales (LABS). En (C) se muestra la relación corriente contra voltaje de canales Nav1.4 nativos. Nótese que la mutación disminuye el efecto del bloqueo de la corriente  $I_{Na+}$ .

Al observar la reducción de la inhibición de la  $I_{Na+}$  en los canales F1579A nos interesó establecer la concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ), el resultado muestra un desplazamiento de la curva  $IC_{50}$  hacia concentraciones más elevadas y un número de Hill mayor a 1 lo cual podría representar que al no encontrar el sitio de interacción de alta afinidad MQ podría estar interaccionando con baja afinidad con otros sitios ( $EC_{50} = 120.29 \pm 1.70 \mu M$ ; No. de Hill =  $2.21 \pm 0.11$ ) (Figura 23A).

En la figura 23B se hace un resumen de los resultados que se han presentado hasta el momento de los experimentos realizados en los diferentes mutantes estudiados, con base en nuestros resultados se propone que MQ es sensible a la presencia de la subunidad  $\beta 1$ , y esto es debido al cambio estructural que favorece los estados de activación e inactivación del canal.



**Figura 23. Efecto de bloqueo de MQ sobre la  $I_{Na+}$  y concentración efecto de canales estudiados.** En (A) se muestra la concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ) de MQ sobre los canales Nav nativos: Nav 1.4 sin y con la subunidad  $\beta 1$ , así como la de canales mutados W756C y F1579A. Nótese el desplazamiento de la curva hacia concentraciones más altas cuando se aplica MQ a los canales Nav1.4 coexpresados con la subunidad  $\beta 1$  y en los canales mutados F1579A. En (B) se presenta la fracción de canales bloqueados por MQ  $60 \mu M$  en los canales mutados probados. Note las mutaciones K1237A y F1579A mostraron una reducción del efecto representativo, y que la mutación K1237C mostro una aumento del efecto (\*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

Como se puede observar en los resultados las mutaciones de los aminoácidos de la boca de canal W756C, Y401C no mostraron un cambio en la afinidad de MQ por el canal y que el aminoácido K1237 muestra un efecto diferente dependiendo de la mutación ya que cuando se muta a alanina se reduce la afinidad de manera significativa y cuando se muta a cisteína aumenta la afinidad de MQ por el canal. La disminución del bloqueo cuando estudió la mutante F1579A nos hace pensar que

MQ ingresa al vestíbulo interno del canal para bloquear el poro por debajo del motivo DEKA. No obstante estos datos, aun es necesario realizar más experimentos para definir el mecanismo exacto por el cual MQ se mueve hacia el interior del canal y si en el interior tiene más de un sólo sitio de interacción.

#### 8.4. Análisis *in silico* de la interacción entre mefloquina y los canales Na<sub>v</sub>1.4

En las siguientes secciones se presentarán los resultados derivados de los análisis *in silico* que nos permitieron sugerir una posible forma de interacción entre MQ y los canales Na<sub>v</sub>1.4.

Inicialmente, se describirá el proceso llevado a cabo para obtener los diferentes modelos del canal Na<sub>v</sub>1.4. Después se tratará el modelamiento de aminoquinolinas MQ, PQ y CIQ. Finalmente se expondrán los resultados de los estudios de dinámica molecular y los estudios de acoplamiento molecular (*docking*).

##### 8.4.1. Generación del modelo del canal Na<sub>v</sub>1.4 mediante modelaje por homología

Uno de los retos más importantes fue el establecimiento del modelo estructural de los canales Na<sub>v</sub>1.4. Esto es porque no se había reportado un modelo cristalográfico del canal de sodio eucariota. Sin embargo, el modelamiento por homología ha sido ampliamente utilizado para establecer el funcionamiento a nivel molecular de los moduladores del canal (Martin LJ y Corry, 2014; Smith y Corry, 2016). En este proyecto se aplicará una modificación de las metodologías establecidas en dos trabajos previos de modelado *in silico*: el modelo realizado por Tikhonov y Zhorov, donde establecieron la importancia de F1236 como sitio de interacción con diferentes moduladores del canal (Tikhonov y Zhorov, 2005), así como el modelo de Scior y colaboradores con el cual permitió estimar la interacción de tolueno con el aminoácido F1579 y de PQ en el vestíbulo externo del canal Na<sub>v</sub> con el aminoácido W756 (Scior *et al.*, 2009; Scior *et al.*, 2011). Desde la implementación de las metodologías mencionadas se han publicado una gran cantidad de canales de sodio bacterianos. Estos canales incluyen los canales bacterianos de *Bacillus halodurans* (NaChBac) (Ren *et al.*, 2001); de *Arcobacter butzleri* (Na<sub>v</sub>Ab) (Payandeh *et al.*, 2011), de la bacteria marina *Magnetococcus sp.* (Na<sub>v</sub>Ms) (McCusker *et al.*, 2012) y del ortólogo de NavBac *alpha proteobacterium* (Na<sub>v</sub>Rh) (Zhang *et al.*, 2012). Sin embargo sólo los canales Na<sub>v</sub>Ab (PDB ID: 3rvy y 5vb8), Na<sub>v</sub>Ms (PDB ID: 3zjz) y Na<sub>v</sub>Rh (PDB ID: 4dxw) tienen estructuras cristalográficas resueltas. Inclusive se han podido obtener estructuras en diferentes estados conformacionales que han permitido estudiar el mecanismo cinético del canal a través de estudios de dinámica molecular (Kaczmarek y Corry, 2014).

Para el modelado de la isoforma del canal Na<sub>v</sub>1.4 se utilizó la secuencia proteica del canal de sodio tipo 4 (Na<sub>v</sub>1.4) de rata (UniProtKB / Swiss-Prot ID: P15390 / SCN4A\_RAT) la cual contiene 1840 aminoácidos (aa).

En la tabla 4 se observa un resumen de las estructuras cristalográficas consideradas para obtener nuestro modelo del canal Na<sub>v</sub>1.4. Los modelos Na<sub>v</sub>Ab, Na<sub>v</sub>Ms y Na<sub>v</sub>Rh guardan una estrecha relación con el dominio III (DIII) en donde la identidad se encuentra entre 18 y 22 % mientras que la similitud se encuentra entre 33 a 41 % de los canales de sodio a excepción de Na<sub>v</sub>PaS que tiene una identidad de 36.1 % con el total de la secuencia de Na<sub>v</sub>1.4 y esto es porque se trata de una estructura de un organismo eucarionte. Sin embargo, esta estructura recién ha sido publicada y su resolución cristalográfica es deficiente (Shen *et al.*, 2017).

**Tabla 4.** Estudio de homología de los modelos cristalográficos de canales Na<sub>v</sub> Bacterianos.

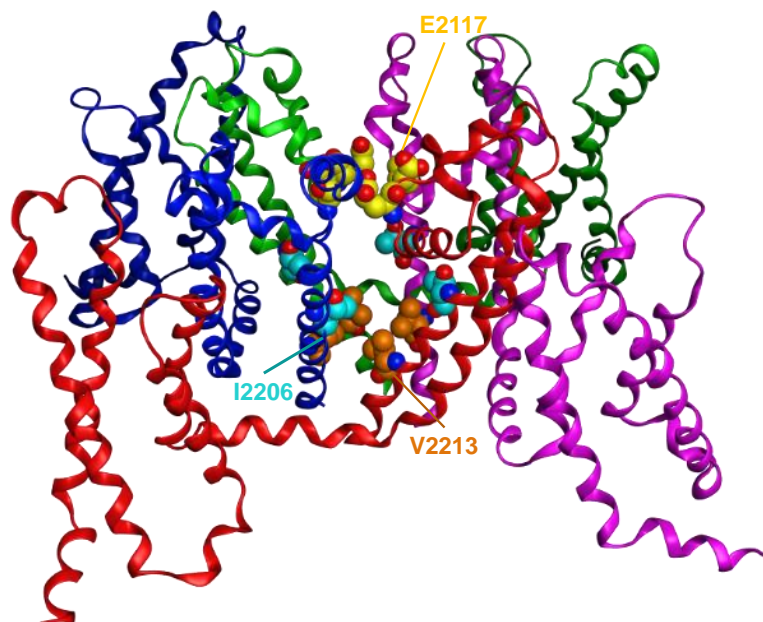
PDB ID	Nombre	Organismo	Fecha	Resolución (Å)	% de Identidad/Similitud <sup>ψ</sup>
3rvy	Na <sub>v</sub> Ab estado pre-abierto	<i>Arcobacter butzleri</i>	13-Jul-11	2.07	20.7 / 40.4
5vb8	Na <sub>v</sub> Ab estado cerrado	<i>Arcobacter butzleri</i>	05-Apr-17	2.85	20.7 / 40.4
3zjz	Na <sub>v</sub> Ms en estado abierto	<i>Magnetococcus marinus</i>	02-Oct-13	2.92	21.9 / 40.9
4dxw	Na <sub>v</sub> Rh	<i>Alpha proteobacterium</i>	23-May-12	3.05	18.2 / 33.8
5x0m <sup>2</sup>	Na <sub>v</sub> PaS	<i>American cockroach</i>	08-Mar-17	3.98	42.8 / 62.0

<sup>2</sup> Este modelo cristalográfico es considerado como un modelo eucariota, sin embargo no se tuvo a disposición durante la preparación del modelamiento por homología.

<sup>ψ</sup> Para el cálculo de la identidad se consideró sólo el segmento de 1013 a 1348 de la secuencia de Na<sub>v</sub>1.4 (UniProtKB / Swiss-Prot ID: P15390 / SCN4A\_RAT) que incluye al dominio III del canal.

Tomando en cuenta este análisis se consideró como plantilla para el modelado del canal Na<sub>v</sub>1.4 la estructura cristalográfica de la subunidad α del canal Na<sub>v</sub>Ab de *Arcobacter butzleri* (PDB ID: 3rvy) (Figura 25). El modelo del canal Na<sub>v</sub>Ab bacteriano está constituido por un solo monómero repetido 4 veces; esta disposición es muy similar a la de los canales de potasio. Sin embargo, este es un mejor modelo que el canal de potasio bacteriano MthK (*Methanobacterium autotrophicum*) que fue utilizado en estudios iniciales de interacción de moduladores del canal (Scior *et al.*, 2009; Scior *et al.*, 2011; Fozzard y Lipkind, 1996; Tikhonov y Zhorov, 2005). La razón principal es que se trata de un canal selectivo a sodio, que es activado por cambios en el potencial de membrana. Además, de que se ha demostrado que posee semejanzas farmacológicas con los canales Na<sub>v</sub> eucariotas como el

bloqueo producido por anestésicos locales como la lidocaína, la benzocaína y la etidocaina (Lee *et al.*, 2012 a y b; Martin y Corry, 2014)

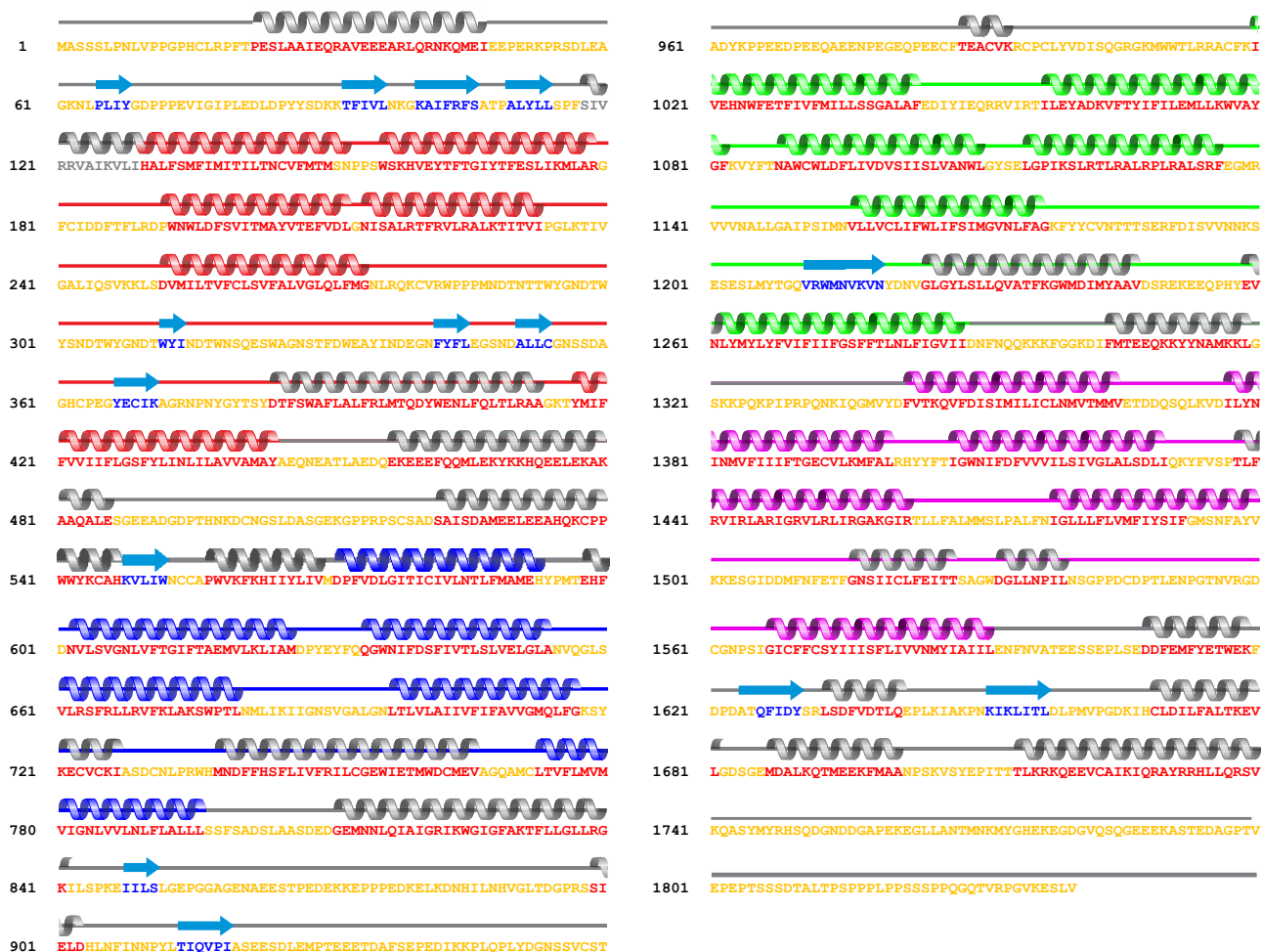


**Figura 24. Estructura cristalográfica de la subunidad  $\alpha$  del canal  $\text{Na}_v$  de *Arcobacter butzleri*.** Se muestra el modelo cristalográfico del canal de *Arcobacter butzleri* ( $\text{Na}_v\text{Ab}$ ) (PDB ID: 3rvy) (Payandeh *et al.*, 2011). Esta proteína procarionta es un homotetrámero que está conformado por cuatro subunidades homólogas a los dominios DI-DIV de los canales eucariotas mostrando en rojo (subunidad 1 similar al DI), azul (subunidad 2 similar al DII), verde (subunidad 3 similar al DIII), magenta (subunidad 4 similar al DIV). Se muestran en esferas el aminoácido E2117 que es parte del filtro de selectividad (representación en esferas color amarillo), y los aminoácidos I2210 (representación en esferas color cian) y V2214 (representación en esferas color naranja) que son el equivalente al sitio de unión del LABS.

Ya que el modelo  $\text{Na}_v\text{Ab}$  no tiene una cobertura completa de la secuencia del canal  $\text{Na}_v1.4$  de rata se estimaron las regiones a modelar utilizando alineamientos múltiples de secuencia, así como el estudio de la estructura secundaria de los canales  $\text{Na}_v1.4$ .

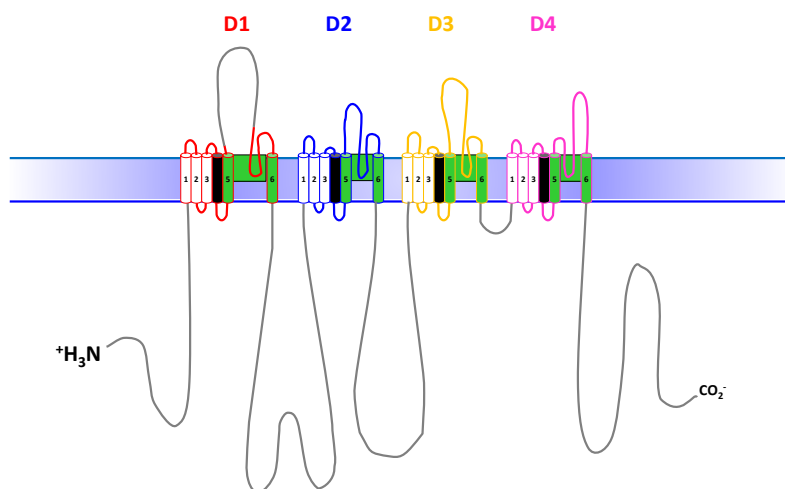
En la figura 25 se observa la estructura secundaria predicha para el canal de sodio  $\text{Na}_v1.4$  que fue obtenida con la ayuda de los servidores Jpred (*Secondary Structure Prediction Server*) (Drozdetskiy *et al.*, 2015); y NPSA (*Consensus secondary structure prediction*) (Combet *et al.*, 2000) utilizando los algoritmos GOR IV, HNNC, Predator, SPOMA, PHD. Después de obtener las diferentes predicciones se estimó y refinó una secuencia consenso de manera manual utilizando estudios de hidropatía y estimación de elementos transmembranales ProtScale (Krogh *et al.*, 2001), TMHMM 2.0

(Rost *et al.*, 1996), y PHDhtm (Wilkins *et al.*, 1999). Como se puede apreciar en la imagen (Secuencia Inferior) la estructura secundaria del canal Nav1.4 se compone mayoritariamente de regiones helicoidales (53 %) con unas pocas regiones beta plegadas (2 %), el resto de los aminoácidos adquieren una conformación de baja complejidad denominada también *coil* (45 %). En la misma imagen (diagramas superiores) se puede observar la correspondencia de la estructura secundaria con los 24 segmentos transmembranales de los cuatro dominios estructurales.



**Figura 25. Estructura secundaria predicha del canal Nav1.4.** Se muestra la conformación establecida mediante los programas Jpred (*Secondary Structure Prediction Server*) y NPSA (*Consensus secondary structure prediction*). En la **primera línea** se observa una representación gráfica de los diferentes dominios estructurales: dominio I (líneas y hélices color rojo); dominio II (líneas y hélices color azul); dominio III (líneas y hélices color verde); dominio IV (líneas y hélices en color magenta). En el mismo esquema las regiones y dominios que conforman parte de las regiones carboxilo y amino terminales así como de los *inter-loops* intracelulares y extracelulares se muestran en color gris; y las regiones  $\beta$  plegadas en azul. En la **segunda línea** se observa la secuencia de aminoácidos de Nav1.4. Como se puede ver el canal presenta un 53 % de regiones  $\alpha$ -hélice (letras en color rojo), un 2 % de regiones  $\beta$ -plegadas (letras en color azul), y un 45% de regiones irregulares “coil” (letras en color amarillo).

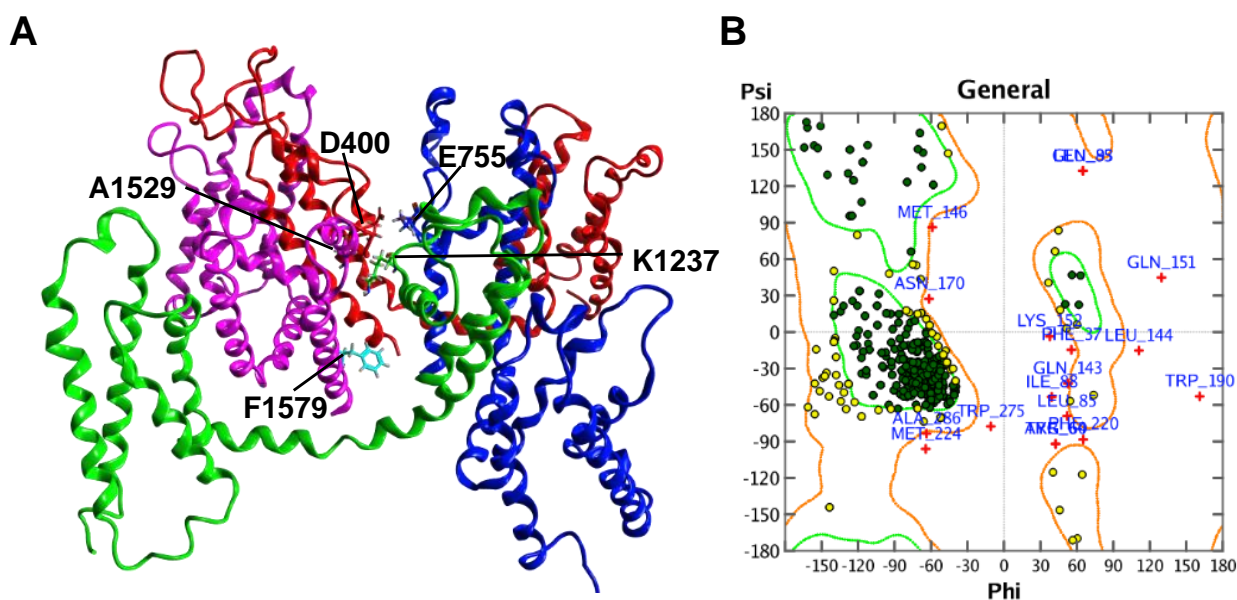
Para la construcción del modelo del canal de Nav1.4 se eligieron para modelar sólo las secuencias correspondientes a los dominios estructurales del canal evitando los segmentos de la región N- y C- terminales y los interdominios que son secuencias *loop* localizadas entre cada dominio (Secuencias: DI 128 – 444 aa y 275-375 aa; DII 565 – 790 aa; DIII 1017 – 1274 aa; DIV 1342 – 1588 aa). Además se evitó la secuencia que une el segmento S5 con el segmento P del DI ya que esta secuencia es grande y parece tomar una conformación globular que interferiría con el modelamiento de las regiones transmembranales. En la figura 26 se muestra una representación de las regiones modeladas para cada dominio estructural del canal Nav1.4.



**Figura 26. Regiones modeladas del canal Nav1.4.** Se muestra la representación topológica de los segmentos modelados que corresponden a los dominios DI-DIV del canal Nav1.4 (rojo [DI], azul [DII], amarillo [DIII] y magenta [DIV]). En gris se muestran los segmentos no considerados para el modelamiento debido a su baja complejidad. Después de seleccionar los segmentos de cada dominio se alinearon con la secuencia de NavAb y posteriormente se hicieron 4 diferentes modelos.

Se realizaron alineamientos múltiples de secuencias (MSA) de nuestra secuencia con la plantilla, después ingresamos estos datos en el programa MOE 2014.09 donde se refinaron y posteriormente se creó un modelo a través de la técnica de modelamiento por homología. Se generaron entonces 4 grupos de estructuras con 100 modelos intermedios utilizando como plantilla estructural el monómero de NavAb para cada uno de los 4 dominios de Nav1.4. Para el modelado de las zonas sin plantilla estructural se utilizaron las librerías de *loops* y rotameros del mismo programa para modelarlas con el método *ab initio*. Todos los modelos se refinaron con el modelo de campo de fuerza (*force field*) OPLS-AA y el modelo de solvatación *Reaction field (R-Field)*. A los mejores modelos de cada grupo de modelos se les aplicó una minimización de energía adicional

fin a bajo los mismos parámetros y una clasificación por energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) seleccionándose el modelo que menor energía presentara. Es esta manera se obtuvieron 4 modelos correspondientes a los diferentes dominios Nav1.4 DI-DIV los cuales se ensamblaron para tener el modelo del canal completo (Figura 27A). Posteriormente los modelos fueron evaluados por su geometría estructural con el módulo de cálculo de la geometría de MOE (*Protein Geometry*) (Figura 27B).



**Figura 27. Modelo por homología del canal Nav1.4 de rata.** En (A) se muestra el modelo generado por homología que contiene los dominios estructurales del canal basados en el canal Nav de *A. butleri* (PDb ID: 3rvy) [DI (rojo); DII (Azul); DIII (verde); DIV (magenta)]. En (B) se muestra el gráfico de Ramachandran que es el análisis de la geometría estructural del modelo, en el cual se puede observar que la mayor parte de las conformaciones caen en las regiones  $\alpha$ -hélices permitidas (puntos verdes y amarillos) con unos cuantos aminoácidos que no tienen conformaciones permitidas, sin embargo, no existen impedimentos estéricos ni energías de interacción elevadas.

Como se puede observar este modelo contiene los 4 dominios que forman el canal selectivo a  $\text{Na}^+$  y a pesar de que en los monómeros no se presentan problemas estructurales, al momento de formar el heterotetrámero aparecen zonas de colisión atómica en estudios posteriores fueron relajados por medio de la minimización de energía a través de dinámica molecular utilizando el programa MOE 2014.09.

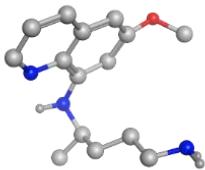
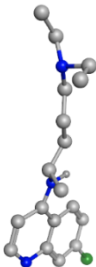
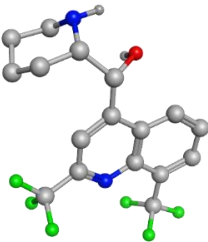
#### 8.4.2. Construcción y refinamiento del ligando mefloquina

Además del modelo estructural del canal se crearon modelos estructurales de las aminoquinolinas (MQ, PQ y CIQ) por medio de técnicas semiempíricas de modelamiento. A continuación, se describe el proceso de la construcción de los modelos.

La estructura 3D de Cloroquina (IUPAC: N4-(7-Chloroquinolin-4-yl)-N1,N1-diethylpentane-1,4-diamine)(ChemSpider ID: 2618; Pubchem ID: 24724536); de primaquina (IUPAC: N4-(6-Methoxy-8-quinolinyl)-1,4-pentanediamine) (ChemSpider ID:4739); y de mefloquina (IUPAC: (R)-[2,8-Bis(trifluoromethyl)-4-quinolinyl][(2S)-2-piperidinyl]methanol) (ChemSpider ID: 401792) se generaron y optimizaron utilizando los programas MarvinBeans Suite para la generación de la molécula, y los programas VegaZZ, Avogadro e HiperChem para optimizar la geometría de la molécula. La adición de cargas y la minimización de energía se realizaron mediante dinámica molecular por el método de Gasteiger utilizando el campo de fuerza (*force field*) OPLS-AA.

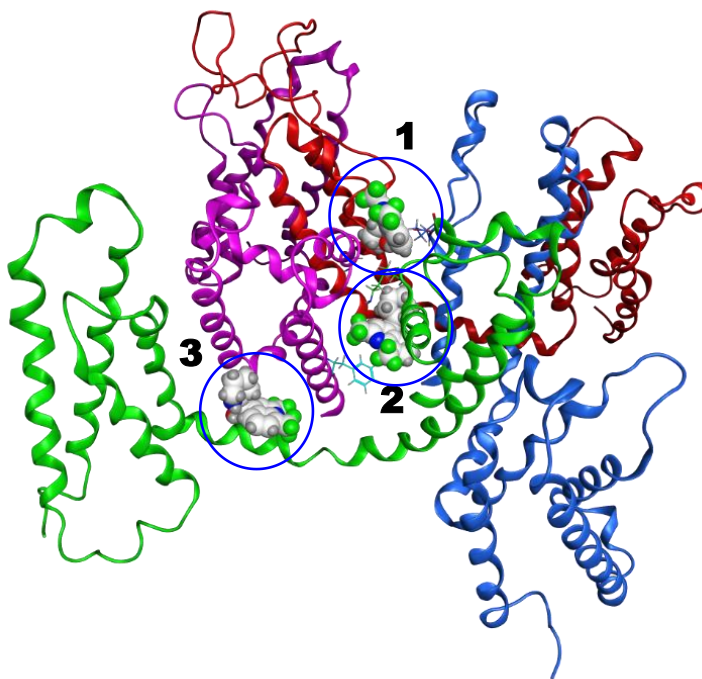
En la Tabla 5, se observan los diferentes modelos obtenidos a través de la metodología descrita arriba así como un resumen de sus características farmacológicas y fisicoquímicas.

**Tabla 5.** Características farmacológicas y fisicoquímicas de las aminoquinolinas CIQ, PQ y MQ.

Propiedad	Cloroquina (CQ)		Primaquina (PQ)		Mefloquina (MQ)	Referencias
Estructura						
pK <sub>a</sub>	3.2 Anillo <sup>1</sup>	10.4 Cadena <sup>1</sup>	8.1 Anillo	9.9 Cadena	8.6 Experimental	[DAB11]
Carga total a pH 7.4	1+ (> 99 % neutro) 2+ (< 0.1 % dicationico)		1+ (<10 % neutro) 2+ (< 0.1% dicationico)		1+ (<3 % neutro)	
Solubilidad en agua	Muy soluble en agua. > 1000 mg/ ml de agua		Soluble en agua. 100 a 1000 mg / ml de agua		Ligeramente soluble en agua, soluble en 0.1 de HCL	[DAB11]
Log P <sup>1</sup> (experim.)	4.6		2.1		3.9	[Drugbank]
Log P (virtual)	5.2		2.4		4.5	[VegaZZ]
PSA/SA [A <sup>2</sup> ]	28/634		103/507		52/578	[VegaZZ]
Lipofilidad	Mucha		poca		intermedia	Comment
Vd [L/Kg] <sup>1</sup> (virtual)	16		4		20	[ADMETpred]
Vd [L/Kg] (experim.)	100-200		3 a 4		16 a 26	Abdi YA <i>et al.</i> , 1995
Half-live	1-2 months		3 to 7 hours		2 to 4 weeks	[Drugbank]
Membrane - fenestration <sup>2</sup>	Muy probable		Menos probable		Probable	
<sup>1</sup> Propiedad calculada teóricamente.						
<sup>2</sup> Análisis estructura actividad						

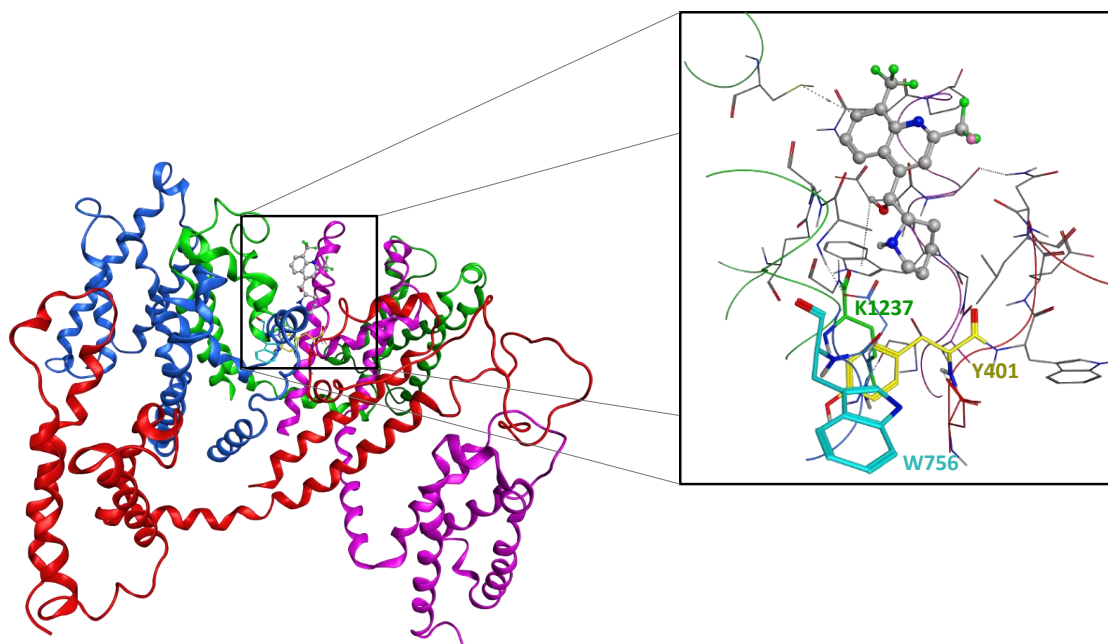
### 8.4.3. Sitios de interacción *in silico* entre MQ y los canales Na<sub>v</sub>1.4

En la figura 28 se muestra la localización de los posibles sitios de interacción entre el canal Na<sub>v</sub>1.4 y MQ predichos por el programa Autodock 4.0 y Autodock Vina. El análisis de acoplamiento molecular (*docking*) muestra la posible existencia de tres sitios de interacción.



**Figura 28. Probables sitios de interacción entre Na<sub>v</sub>1.4 y mefloquina.** Se muestra la posición probable de interacción de MQ en el poro del canal. Se observa el DI (rojo), el DI (azul), el DIII (verde), el DIV (magenta). Encerrados en círculos azules se presentan los probables sitios de unión: 1) boca externa del canal, 2) sitio LABS; 3) Fenestración entre DIII y DIV.

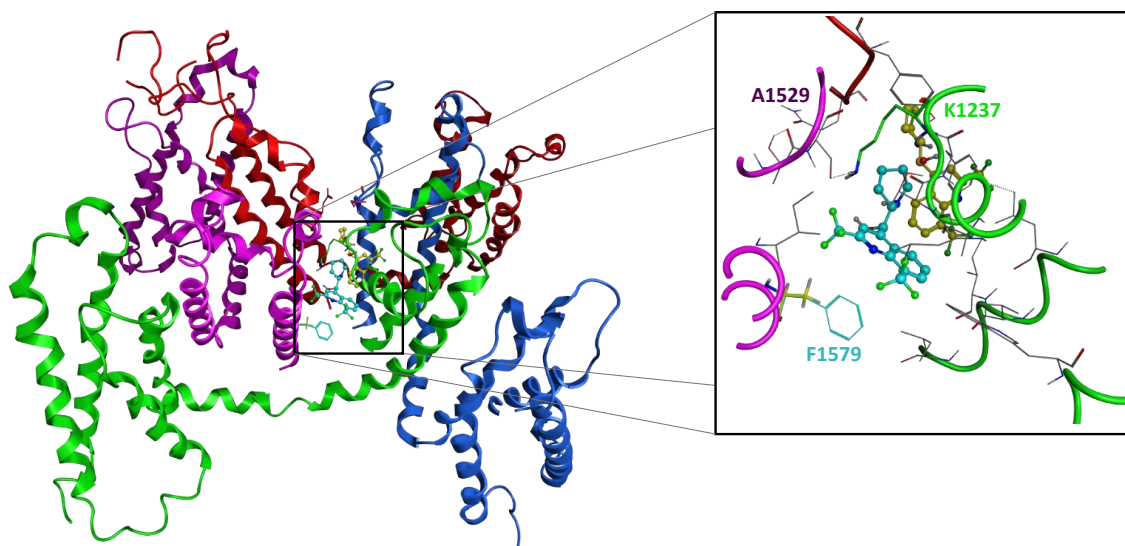
El primer sitio de interacción de MQ sobre los canales Na<sub>v</sub>1.4 está localizado en la boca externa del canal por encima del motivo DEKA (Figura 29). Este sitio es similar al reportado para PQ en estudios anteriores donde el W756 es esencial para la interacción (Salinas-Stefanon *et al.*, 2011). En este sitio MQ podría unirse a aminoácidos del filtro de selectividad orientándose con ayuda de su amina cargada del anillo piperidil que duplicaría la interacción que ejercería la carga positiva del Na<sup>+</sup>. Como se estableció en las secciones 8.3.1 y 8.3.2 no se obtuvo una reducción de la inhibición de la I<sub>Na+</sub> al mutar aminoácidos pertenecientes a este sitio como Y401 y W756. Planteándose que MQ podría no tener interacción con este sitio o de tenerla esta sería de baja afinidad



**Figura 29. Análisis del sitio de unión relacionado con la boca externa del canal.** Se muestra el modelo de interacción en el que MQ se une en el labio externo del canal de manera similar a PQ según estudios de Salinas-Stefanon. Se observa el DI (rojo), el DII (azul), el DIII (verde), el DIV (magenta). Obsérvese que en el modelo MQ obstruye la boca externa del canal interaccionando con su amina cargada con los aminoácidos del filtro de selectividad (motivo DEKA), así como también que residuos adyacentes participan en la interacción (por ejemplo Y401).

El segundo sitio de interacción de MQ en el canal Nav1.4 está localizado en una región relacionada con el LABS. En canales Nav1.4 y Nav1.2 se ha estudiado que los aminoácidos F1579 y Y1586 del DIV-S6, L1280 del DIII-S6, y N434 del DI-S6 son esenciales para la interacción entre fármacos de tipo AL y los canales (Catterall y Swanson, 2005). Como se puede observar en la figura 30 la MQ interacciona a través de una unión de tipo  $\pi$ - $\pi$  entre el grupo arilo de la fenilalanina F1579 con el anillo de quinolina, donde la carga positiva de la amina del anillo piperidil se orienta hacia la lisina K1237 del motivo DEKA. Este hecho quedó comprobado al observar la reducción de la inhibición de la  $I_{Na^+}$  que se presenta cuando se sustituye la fenilalanina por alanina en la posición 1579 (F1579A) (véase Sección 8.3.4).

Al realizar la sustitución de la fenilalanina 1579 por alanina en el modelo *in silico* se pudo constatar también la pérdida de afinidad por el sitio antes descrito. En el modelo del canal con la mutación F1579A, MQ no tiene la posibilidad de interaccionar con el grupo arilo de la F1579 pero encuentra otros sitios donde mayoritariamente interacciona con sitios hidrofóbicos al interior del canal (véase Figura 30).



**Figura 30.** Sitio de interacción de mefloquina en el LABS del interior del canal Nav1.4. En color cian se muestra la posición representativa de MQ en el sitio de interacción LABS reportado para AL en canales Nav<sub>v</sub>1.4 Nativos. MQ interactúa a través de una unión de tipo  $\pi$ - $\pi$  entre el grupo arilo de la fenilalanina F1579 con el anillo de quinolina, donde la carga positiva de la amina del anillo piperidil se orienta hacia la lisina K1237 del motivo DEKA. En color amarillo se observa una posición representativa de MQ en una región hidrofóbica localizada entre los dominios DI y DII. Se observa el DI (rojo), el DII (azul), el DIII (verde), el DIV (magenta).

Otro sitio de interacción entre MQ y el canal Nav<sub>v</sub>1.4 localizado a través de los estudios de acoplamiento molecular (*docking*) en una región de fenestración localizada entre DI y DIV. Este sitio no fue corroborado mediante estudios electrofisiológicos dado que no tenía una relación con el efecto de inhibición de la  $I_{Na^+}$ , sin embargo tiene relevancia porque estos sitios se han hipotizado por Payandeh *et al.* como accesos directos para el bloqueo del poro por fármacos liposolubles como algunos anestésicos locales y como la MQ (Figura 28) (Payandeh *et al.*, 2012).

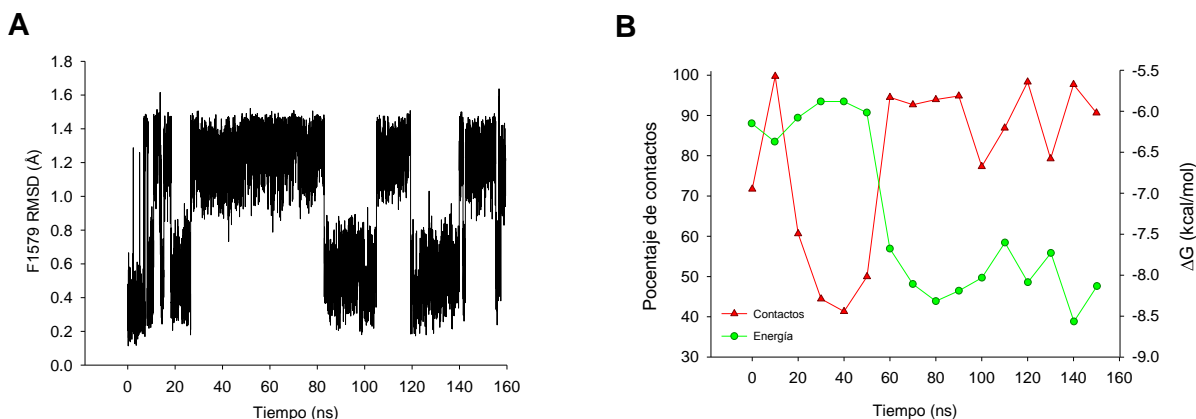
Una propuesta del mecanismo de acción de MQ es que el fármaco entraría al poro utilizando las fenestraciones como vía de acceso. Una vez allí MQ interactuaría en el sitio LABS como se menciona anteriormente.

#### 8.4.4. Estudios de la interacción de MQ a los canales Nav<sub>v</sub>1.4 por medio de dinámica molecular

Para establecer un modelo más detallado de la interacción entre MQ y los canales Nav<sub>v</sub>1.4, se generó un nuevo modelo que solo representaba a la región del poro del canal y se desarrolló un estudio de dinámica molecular (DM). Cabe mencionar que este trabajo estuvo a cargo del Dr. Ángel A. Islas Navarrete, utilizando la infraestructura del Laboratorio Nacional de Supercomputo (LNS) del Sureste de México.

En este estudio se utilizó como modelo la estructura cristalográfica del canal de sodio de la bacteria *A. butzleri* (PDB ID: 3RVY) (Berman *et al.*, 2000). Se aplicó una metodología similar a la descrita en la sección 8.4.1, para generar un modelo final con el programa MODELLER 9.12. Posteriormente el modelo del poro se incrustó en una bicapa lipídica, con disolvente explícito y fue neutralizado con NaCl 0.1 M. Después se realizaron simulaciones computacionales a través del programa NAMD para obtener hasta 159 ns de interacción. Estas simulaciones indicaron que la cadena lateral de F1579 del LABS fluctuó entre dos conformaciones semidiscretas (Figura 31A).

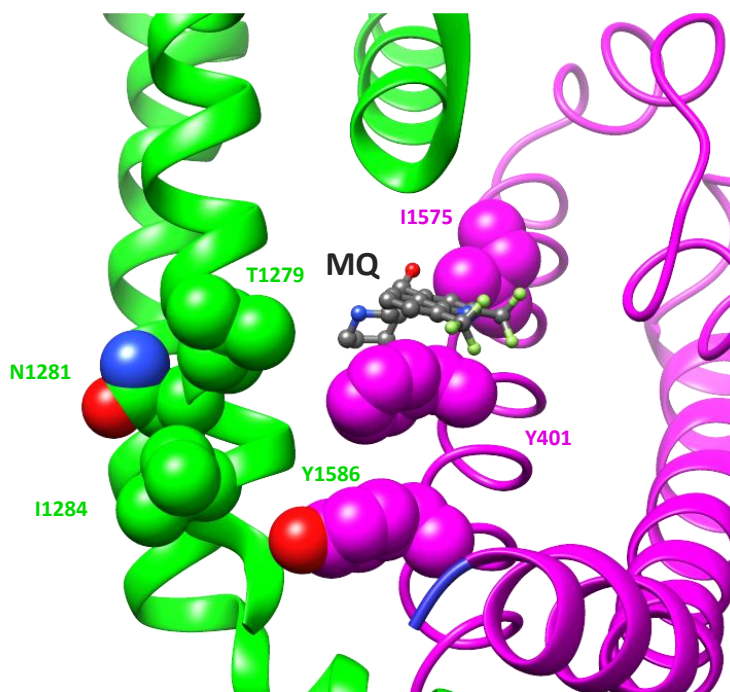
Después de 30 ns de simulación, la cadena lateral se estableció en una conformación más distal al filtro de selectividad de mamífero, específicamente a la lisina 1237 del DIII. Tomamos muestras cada 10 ns a lo largo de las trayectorias de la Dinámica Molecular y realizamos simulaciones de acoplamiento molecular (*docking*), observamos posiciones de unión energéticamente favorables para la mefloquina en cada muestra dentro de 3,6 Å de F1579. El tamaño de la población (en el que la mefloquina interactúa con F1579) y la energía libre de las mejores posturas se muestran en la figura 31B. Los resultados sugirieron que la MQ muestra una mayor ocupación y afinidad por la conformación proximal de F1579.



**Figura 31. Fluctuación de F1579 del LABS del canal Na<sub>v</sub>1.4 y resultados de acoplamiento de la mefloquina con F1579 obtenidos por dinámica molecular.** Se muestra en (A) La desviación cuadrática media (RMSD) de F1579 a lo largo de la simulación DM indica que la cadena lateral de este residuo alterna entre una conformación proximal y distal del filtro de selectividad. En (B) el porcentaje de poses de unión en las que la mefloquina contacta con F1579 en función del tiempo durante las simulaciones de Dinámica Molecular (Línea roja), así como los valores de energía libre para los mejores acoplamientos de mefloquina al canal que interactúan con F1579 (Línea verde).

Debido a que en la simulación computacional solo estaba presente el modelo del poro junto con la membrana y a la dificultad que existe de la parametrización a nivel cuántico de MQ para la

DM, empleamos un método de acoplamiento estructural de ajuste inducido (*induce-fit*) posterior a un acoplamiento (*docking*) de receptor rígido para establecer un modelo más fidedigno de la interacción entre MQ y el canal Nav1.4. MQ interacciona a través de una unión de tipo  $\pi$ - $\pi$  entre el grupo arilo de la fenilalanina F1579 con el anillo de quinolina, donde la carga positiva de la amina del anillo piperidil se orienta hacia lumen del poro. El acercamiento de la MQ es posible gracias a la formación de un bolsillo hidrofóbico localizado entre los segmentos S6 de los dominios DIII y DIV donde F1579 son cruciales para la inhibición de la  $I_{Na^+}$  (Figura 32).



**Figura 32. Resultados de acoplamiento de ajuste inducido de mefloquina después de 80 ns de simulaciones DM del canal Nav1.4.** Pose de unión de MQ (gris) sobre el canal Nav1.4 obtenida mediante el acoplamiento de una muestra tomada a 80 ns de la DM. MQ forma una interacción de tipo  $\pi$ - $\pi$  paralela con el grupo arilo de F1579. Todos los resultados calculados indican que el compuesto se une a una cavidad hidrofóbica entre los dominios DIII (verde) y DIV (magenta). Los residuos conservados entre las 9 isoformas de mamíferos que constituyen el LABS se muestran representados con su radios de Van der Waals. Esta representación es comparable con el último modelo publicado de LABS en Nav1.2 (Catterall y Swanson, 2015).

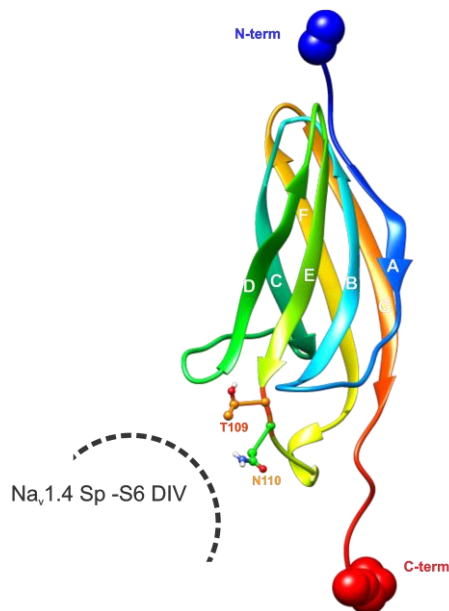


proteína de adhesión P0 (PDB ID: 1NEU\_A). Esta proteína ha sido utilizada ampliamente para el modelaje de la subunidad  $\beta$ 1 sin embargo no proporcionaba información sobre la interacción con  $\alpha$  (Islas et al., 2013).

Expandiendo la búsqueda y tomando en consideración las características del dominio semejante a las inmunoglobulinas (*Ig-like domain*) conservado de la subunidad  $\beta$ 1 se hallaron plantillas estructurales que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas (ver Scior *et al.*, 2015 para mayor detalle). Estas nuevas plantillas poseen baja homología (entre 19 y 10 % de Identidad), pero poseen interfaces similares a la que tienen las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del canal de sodio.

Después de evaluar todas las interfaces de estas plantillas se determinó que el complejo del receptor TLR4 y su ligando MD2 (PDB Id: 3FXI) posee un sitio de interacción localizado en el dominio CDR2 presente también en muchas inmunoglobulinas. Después de varios análisis topológicos y estructurales de este sitio, se correlacionó este conocimiento con modelo *in silico* que se había generado y se identificó el mismo dominio presente en la subunidad  $\beta$ 1 (ver figuras C1 a C6 en el Apéndice C).

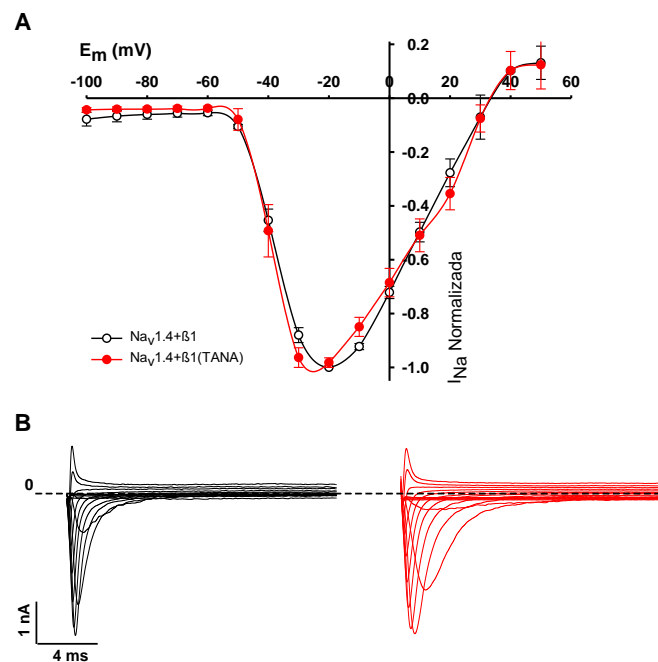
Teniendo presente esta información se seleccionaron dos aminoácidos T109 y N110 que según nuestras observaciones son esenciales para la interacción con la subunidad  $\alpha$  (Figura 34).



**Figura 34. Interacción entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de los canales Nav1.4.** Se muestra el modelo estructural establecido por modelamiento por homología y refinamiento manual utilizando como modelo la proteína de adhesión P0 (PDB ID: 1NEU\_A) mediante el programa SCWRL, también se muestra la interface que se establece entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  y los aminoácidos T109 y N110 del dominio globular de la subunidad  $\beta$ 1 que fueron mutados para probar esta hipótesis.

Después de establecer la posible interfase entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de los Nav1.4 se mutaron los aminoácidos T109, N110 a alanina y se realizó la expresión y registros electrofisiológicos en células de ovario de hámster (CHO).

Como se observa en la figura 35, la mutación de T109, N110 produjo un enlentecimiento de la inactivación de los canales sin modificar el potencial de activación inactivación y de la amplitud máxima de la  $I_{Na+}$ . Similar a lo observado en ausencia de la subunidad  $\beta 1$ . Este comportamiento demuestra la pérdida de afinidad entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Una propuesta a este fenómeno es que la modificación de estos dos aminoácidos altera la interface entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  debido a un cambio electrostático generado por las mutaciones.



**Figura 35. Efecto de la mutación de la subunidad  $\beta$  en la cinética de los canales Nav1.4.** Se muestra en (A) La relación corriente contra voltaje de dos grupos de experimentos, un grupo fue transfectado con Nav1.4+ $\beta 1$  nativa (trazos negros) y el segundo con la subunidad  $\beta 1$  mutada en los aminoácidos T109 y N110 a alanina Nav1.4+ $\beta 1$ (TANA) (trazos rojos), los registros se obtuvieron aplicando un protocolo de estimulación de 30 ms con un potencial de sostenimiento de -100mV con pulsos despolarizantes cada 10mV hasta +50mV a 1Hz realizado en células de ovario de hámster (CHO). En (B) se muestran un conjunto de trazos representativos de los registros electrofisiológicos de Nav1.4+ $\beta 1$  nativa (trazos negros) y Nav1.4+ $\beta 1$ (TANA). Obsérvese el enlentecimiento de la inactivación sin la modificación de los potenciales de activación, inversión y la amplitud máxima de la  $I_{Na+}$ .

## 9. DISCUSIÓN

Los canales iónicos de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje (Nav) son un grupo de canales responsables del inicio y propagación del potencial de acción en células eléctricamente excitables. Este canal es blanco de diversos fármacos que afectan su cinética, tales como las aminoquinolinas entre las cuales se halla a la mefloquina (MQ).

Se ha demostrado que los compuestos derivados de la quinolina, tales como la cloroquina, la PQ y la MQ pueden modificar las corrientes de canales Nav (Lopez-Izquierdo *et al.*, 2011; Orta-Salazar *et al.*, 2002; Perez-Cortes *et al.*, 2015; Rodriguez-Menchaca *et al.*, 2008; Sanchez-Chapula *et al.*, 2001). La MQ es un fármaco que se ha utilizado para el tratamiento de cepas de *Plasmodium* resistentes a las otras quinolinas tales como la ClQ (Winstanley, 1996) y se ha mencionado que este es un fármaco bloqueador de canales iónicos con propiedades químicas y fisiológicas interesantes (Perez-Cortes *et al.*, 2015; Quinn, 2015). Los efectos secundarios de este fármaco, en el sistema cardiovascular, plantean la posibilidad de su uso como tratamiento farmacológico antiarrítmico. Sin embargo, no existen estudios acerca de la interacción de MQ con el canal Nav, ni de los efectos moduladores de este fármaco en la conducción iónica. En este trabajo, se utilizó a la MQ como herramienta farmacológica para investigar su sitio de unión sobre el canal Nav1.4 del músculo esquelético, así como proponer su mecanismo de interacción, utilizando registros electrofisiológicos, mutagénesis puntual sitio dirigida y modelos computacionales.

Los resultados mostrados en este trabajo demuestran que MQ es un bloqueador del poro del canal Nav1.4 dependiente de la concentración del fármaco, así como de la frecuencia y produce un desplazamiento de la inactivación de forma significativa, así como de la conductancia. Esto es similar al comportamiento del bloqueo ejercido por anestésicos locales con propiedades antiarrítmicas como la lidocaína (McDonald *et al.*, 1989; Grant, 2001; Scholz, 2002). Es conocido que los fármacos antiarrítmicos bloquean a los canales Nav por medio de mecanismos complejos que dependen del estado del canal, la frecuencia y el voltaje, todas estas propiedades son importantes para establecer mecanismos de acción que apoyen a explicar sus efectos terapéuticos (Alvarenga *et al.*, 2002; Carmeliet, 1999; Hille 2001). El mecanismo por el cual realizan este tipo de bloqueo moduladores de relevancia clínica (p. ej. lidocaína y carbamazepina), consiste en una inhibición compleja de la corriente de sodio, produciendo un bloqueo tónico y fásico (dependiente del uso), que generalmente involucra cambios hacia potenciales más negativos; lo que indica que estos se unen con mayor

afinidad al estado inactivado del canal (Cummins et al, 2007; Snyders et al, 1992). Este tipo de cinética fue la observada en el canal Nav1.4 donde la  $V_{1/2}$  es llevada a voltajes más negativos en comparación con el control. Además, la MQ también modificó el voltaje de la apertura del canal llevándolo hasta voltajes más negativos. Este tipo de modulación de la apertura del canal se observa cuando la subunidad  $\beta 1$  modifica la recuperación “gating” por lo que se propone que MQ probablemente se une a un sitio relacionado con la interacción de la subunidad  $\beta 1$  ya que se ha propuesto que la subunidad  $\beta 1$  estabiliza a la subunidad  $\alpha$  en una conformación que inactiva y recupera de modo más rápido (Bennett et al., 1993).

La coexpresión de la subunidad  $\alpha$  y  $\beta 1$  en los ovocitos de *Xenopus leavis* modifica la cinética que tiene el canal al interactuar con MQ, como se ve en la sección 8.2 la afinidad es drásticamente mermada dado que se necesitan concentraciones  $IC_{50}$  de hasta 128  $\mu M$  de MQ así también la conducción se ve desplazada hacia voltajes más positivos pero en este caso la inactivación no se ve modificada posiblemente debido a que la subunidad  $\beta 1$  está modificando la conformación del canal haciendo que sea menos susceptible al efecto provocado por MQ. Este resultado puede sustentarse en que existe un cambio de la cinética del canal provocado por la presencia de la subunidad  $\beta 1$  ya que se ha reportado en la literatura que esta subunidad controla la aceleración de la inactivación y modifica la dependencia del voltaje de inactivación hacia potenciales de membrana más negativos y lo hace con más eficiencia en canales Nav1.4 y no así en canales Nav1.5 (Isom, 1992; Nuss et al., 1995; Brackenbury e Isom, 1999 y 2011).

Los análisis de acoplamiento molecular (*docking*) nos mostraron diferentes sitios de interacción que fueron probados. El primero está localizado en la boca externa del canal por encima del motivo DEKA que corresponde al sitio reportado para PQ en estudios anteriores donde el W756 es esencial para la interacción, lo cual concuerda con estudios previos realizados con PQ (Salinas-Stefanon et al., 2011). Este sitio fue analizado en canales Nav1.4 mutantes donde se sustituyó el triptófano localizado en la posición 756 por cisteína (W756C), los resultados mostraron que el efecto de MQ a concentraciones de MQ 60  $\mu M$  se mantenía similar que el mostrado sobre canales nativos. Esto permite demostrar que MQ no tiene el mismo sitio de interacción que PQ en el anillo de triptofanos en el labio externo del canal que anteriormente se describió en el laboratorio.

Se probó otro sitio sugerido por los análisis de acoplamiento molecular (*docking*), la tirosina localizada en la posición 401 (Y401) un residuo que ha sido reconocido como un sitio de interacción para toxinas como la TTX o la STX (Terlau et al., 1991; Stephan et al., 1994; Sunami et al., 2000;

Fozzard y Lipkind, 2010). Al encontrarse este aminoácido en el vestíbulo externo del canal nuestra hipótesis era que al no unirse con W756 MQ podría interactuar con otro residuo cercano. Sin embargo, no se observó un cambio en la inhibición de la corriente con la aplicación de MQ 60  $\mu\text{M}$  cuando se probó la mutación de este aminoácido por lo que esta hipótesis fue descartada.

Continuando la búsqueda del sitio de interacción en el labio externo del canal se probó un tercer aminoácido que había tenido posiciones estructurales favorables en las simulaciones computacionales y que antes había tenido una ligera influencia sobre la afinidad de PQ declarado por Salinas-Stefanon *et al.*, en 2011 (Salinas-Stefanon *et al.*, 2011). Este aminoácido fue la lisina en la posición 1237, la cual fue mutada por alanina (K1237A) y cisteína (K1237C). Estas mutaciones tuvieron un efecto interesante, ya que se observó que la mutación K1237C lograba incrementar la potencia del efecto de MQ pero no así la mutación K1237A.

El último sitio mutado fue la fenilalanina F1579 que se ha propuesto junto con la tirosina (Y1586) del S6 del DIV como parte del LABS (Lipkind y Fozzard, 2005). Los resultados observados de la reducción de la inhibición de MQ 60  $\mu\text{M}$  nos dieron evidencia de que ese residuo participa en la interacción. Este hallazgo nos da una explicación al comportamiento observado en la cinética de los canales inhibidos con MQ, ya que es muy parecido al reportado para anestésicos locales como la lidocaína (Catterall y Swanson, 2015; Hille, 1977; Makielski *et al.*, 1999; Wang y Strichartz, 2012).

Tomando en consideración los resultados de los análisis electrofisiológicos junto con los computacionales, se sugiere que MQ interactúa a través de una unión  $\pi$ - $\pi$  entre su anillo de quinolina y el grupo arilo de F1579 en una cavidad hidrófoba donde también participa I1575 y que la carga positiva del grupo piperidil se orienta hacia la lisina del anillo DEKA en el lumen del poro. Así la vía de acceso al vestíbulo interno podría estar relacionada nuevamente con su similitud fisicoquímica a los anestésicos locales dado que la MQ es una molécula anfipática que puede interactuar con la membrana celular y acceder por medio de la fenestración localizada entre DI y DIV, estos sitios se han sugerido por Payandeh y *et al.* como accesos directos para el bloqueo del poro por fármacos liposolubles como algunos anestésicos locales y como lo podría hacer la MQ (Payandeh *et al.*, 2012; O'Reilly *et al.*, 2012). De hecho fármacos como la lidocaína y la quinidina deben de pasar la membrana plasmática para acceder a este sitio a través de la boca citoplasmática del poro, este mecanismo es favorecido por la apertura del canal, etapa durante la cual los fármacos acceden al poro (Hanck *et al.*, 2000; Catterall *et al.*, 2007).

## 10. CONCLUSIONES

- La mefloquina es un bloqueador de poro del canal de sodio Nav1.4, su bloqueo depende de la concentración del fármaco y modifica los estados de activación e inactivación del canal.
- En los canales de músculo esquelético Nav1.4 existe una diferencia de afinidad producto de la modulación de la subunidad  $\beta 1$ , que posiblemente se deba al cambio estructural que la subunidad  $\beta 1$  tiene sobre los canales para favorecer estados de inactivación y recuperación.
- En canales Nav1.4 con la mutación W756C no se modificó de manera significativa la sensibilidad al bloqueo por MQ estableciendo que mefloquina no comparte el sitio de interacción de primaquina reportado por Salinas-Stefanon *et al.*
- En canales Nav1.4 con la mutación F1579A se disminuyó de manera significativa la sensibilidad del canal al bloqueo por MQ proponiéndose que este aminoácido es esencial para la interacción de MQ en el canal.
- En canales Nav1.4 con la mutación K1237A no se modificó de manera significativa la sensibilidad al bloqueo por MQ. Contrario a este resultado la mutación K1237C aumento la sensibilidad del canal probablemente por el aumento de hidropatía del sitio de unión de MQ.
- Los análisis computacionales muestran que MQ interacciona a través de una unión de tipo  $\pi$ - $\pi$  entre el grupo arilo de la fenilalanina F1579 con el anillo de quinolina, donde la carga positiva de la amina del anillo piperidil se orienta hacia lumen del poro.
- A través de un estudio de función estructural y modelamiento molecular se dedujeron dos aminoácidos claves para la interacción entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del canal Nav1.4, que fueron corroboradas mediante estudios electrofisiológicos.

## 11. PERSPECTIVAS

La evidencia obtenida en este trabajo de tesis muestra que la afinidad de MQ se reduce por la mutación del aminoácido F1579 por alanina, este aminoácido forma parte importante del LABS. En los registros se observa una ligera disminución del efecto provocado por MQ. Sin embargo, no se recupera la totalidad de la corriente por lo que la propuesta es que se realicen estudios más profundos de la cinética con esta mutación. Las características fisicoquímicas del canal permiten proponer que MQ se comporta como un anestésico local con actividad antiarrítmica, se podrían hacer ensayos de competencia de fármacos por el sitio de interacción no sólo del LABS sino también con toxinas que se unen de manera extracelular para resolver si MQ tiene más de un sitio de interacción, así también, deben de realizarse ensayos de afinidad durante el estado cerrado del canal para comprobar si MQ realmente puede acceder a su sitio de interacción por medio de las fenestraciones. Otra propuesta es estudiar si MQ puede alterar de igual forma la cinética de los canales de Nav1.5 y Nav1.7 los cuales, responden de diferente forma a la unión de la subunidad  $\beta 1$  y también a los fármacos.

## 12. REFERENCIAS

- Aarnoudse AL, van Schaik RH, Dieleman J, Molokhia M, van Riemsdijk MM, Ligthelm RJ, Overbosch D, van der Heiden IP y Stricker BH.** *MDR1 gene polymorphisms are associated with neuropsychiatric adverse effects of mefloquine.* Clin Pharmacol Ther. 2006;80(4):367-374.
- Abdi YA, Gustafsson LL, Ericsson Ö y Hellgren U.** *Handbook of Drugs for Tropical Parasitic Infections Second Edition.* Taylor&Francis. 2003.
- Achieng A, Rawat M, Ogutu B, Guyah B, Ong Echa JM y Perkins DJ, Kempaiah P.** *Antimalarials: Molecular Drug Targets And Mechanism of Action.* Curr Top Med Chem. 2017;17(19):2114-2128.
- Ajay-Murcko MA.** *Computational methods to predict binding free energy in ligand-receptor complexes.* J Med Chem. 1995;38(26):4953-4967.
- Alvarenga N, Ferreira RM y Mont L.** *Fármacos antiarrítmicos.* JANO, Medicina y Humanidades. 2002;1447:66-73.
- Aqvist J, Medina C y Samuelsson JE.** *A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design.* Protein Eng. 1994;7(3):385-391.
- Armstrong CM y Bezanilla F.** *Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments.* J Gen Physiol. 1977a;70(5):567-590.
- Armstrong CM y Hille B.** *Voltage-gated ion channels and electrical excitability.* Neuron. 1998;20(3):371-380.
- Balser JR.** *The cardiac sodium channel: gating function and molecular pharmacology.* J Mol Cell Cardiol. 2001;33(4):599-613.
- Banfield MJ, Naylor RL, Robertson AG, Allen SJ, Dawbarn D, et al.** *Specificity in Trk receptor:neurotrophin interactions: the crystal structure of TrkB-d5 in complex with neurotrophin-4/5.* Structure. 2001;9(12):1191-1199.
- Barnes S y Hille B.** *Veratridine modifies open sodium channels.* J Gen Physiol. 1988;91(3):421-443.
- Baukowitz T y Yellen G.** *Modulation of K<sup>+</sup> current by frequency and external [K<sup>+</sup>]: a tale of two inactivation mechanisms.* Neuron. 1995;15(4):951-960.
- Beneski DA y Catterall WA.** *Covalent labeling of protein components of the sodium channel with a photoactivable derivative of scorpion toxin.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1980;77(1):639-643.
- Bennett PB Jr, Makita N y George AL Jr.** *A molecular basis for gating mode transitions in human skeletal muscle Na<sup>+</sup> channels.* FEBS Lett. 1993;326(1-3):21-24.
- Berman HM, Battistuz T, Bhat TN, Bluhm WF, Bourne PE, Burkhardt K, Et al.** *The Protein Data Bank.* Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2002;58(Pt 6 No 1):899-907.
- Bezanilla F, Armstrong CM.** *Inactivation of the sodium channel. I. Sodium current experiments.* J Gen Physiol. 1977;70(5):549-566.
- Bloomquist JR.** *Ion channels as targets for insecticides.* Annu Rev Entomol. 1996;41:163-190.
- Bourne PE, Weissig H.** *Structural bioinformatics (methods of biochemical analysis) paperback.* Hoboken NJ: Wiley-Liss. 2003.
- Bouyain S y Watkins DJ.** *The protein tyrosine phosphatases PTPRZ and PTPRG bind to distinct members of the contactin family of neural recognition molecules.* Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107(6):2443-2448.
- Brackenbury WJ e Isom LL.** *Voltage-gated Na<sup>+</sup> channels: potential for beta subunits as therapeutic targets.* Expert Opin Ther Targets. 2008;12(9):1191-1203.
- Brackenbury WJ y Isom LL.** *Na Channel  $\beta$  Subunits: Overachievers of the Ion Channel Family.* Front Pharmacol. 2011;2:53.
- Buisine E, Wieruszkeski JM, Lippens G, Wouters D, Tartar A y Sautiere P.** *Characterization of a new family of toxin-like peptides from the venom of the scorpion Leiurus quinquestriatus hebraeus. 1H-NMR structure of leiuopeptide II.* J Pept Res. 1997;49(6):545-555.
- Cai W, Li J y Yip S.** *1.09 Molecular Dynamics de Comprehensive.* en *Comprehensive Nuclear Materials.* Konings RJM (editor). Amsterdam: Elsevier. 2012;(1):249-265
- Campos FV, Chanda B, Beirão PS y Bezanilla F.**  *$\beta$ -Scorpion toxin modifies gating transitions in all four voltage sensors of the sodium channel.* J Gen Physiol. 2007;130(3):257-268.
- Carmeliet E y Mubagwa K.** *Antiarrhythmic drugs and cardiac ion channels: mechanisms of action.* Prog Biophys Mol Biol. 1998;70(1):1-72.
- Carmeliet E.** *Antiarrhythmic drugs and ion channels: have we made the connection?* J Cardiovasc Electrophysiol. 1999;10(5):755-759.
- Catterall WA y Swanson TM.** *Structural Basis for Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels.* Mol Pharmacol. 2015;88(1):141-150.
- Catterall WA, Cestèle S, Yarov-Yarovoy V, Yu FH, Konoki K y Scheuer T.** *Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins.* Toxicon. 2007;49(2):124-141.

- Catterall WA, Goldin AL y Waxman SG.** *International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels.* Pharmacol Rev. 2005;57(4):397-409.
- Catterall WA.** *From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels.* Neuron. 2000;26(1):13-25.
- Catterall WA.** *Structure and function of voltage-gated sodium channels at atomic resolution.* Exp Physiol. 2014;99(1):35-51.
- Catterall WA.** *Voltage-Gated Sodium Channels at 60: Structure, Function, and Pathophysiology.* J Physiol. 2012;590, 2577-2589.
- Cebada J y Salinas E.** *Chloroquine selectively blocks the inward rectifying potassium channel in dog cardiac myocytes. The intracellular effect.* Biophys. J. 1994;66:A211
- Cestèle S y Catterall WA.** *Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels.* Biochimie. 2000;82(9-10):883-892.
- Cestèle S, Yarov-Yarovoy V, Qu Y, Sampieri F, Scheuer T y Catterall WA.** *Structure and function of the voltage sensor of sodium channels probed by a beta-scorpion toxin.* J Biol Chem. 2006;281(30):21332-21344.
- Chemist A.** *ChemSpider SyntheticPages.* 2001.
- Chen C y Cannon SC.** *Modulation of Na<sup>+</sup> channel inactivation by the beta 1 subunit: a deletion analysis.* Pflugers Arch. 1995;431(2):186-195.
- Chen H y Heinemann SH.** *Interaction of scorpion alpha-toxins with cardiac sodium channels: binding properties and enhancement of slow inactivation.* J Gen Physiol. 2001;117(6):505-518.
- Chen R, Buyan A y Corry B.** *Voltage-Gated Sodium Channel Pharmacology: Insights From Molecular Dynamics Simulations.* Adv Pharmacol. 2017;79:255-285.
- Clare JJ, Tate SN, Nobbs M y Romanos MA.** *Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets.* Drug Discov Today. 2000;5:506-520.
- Clark RB, Sanchez-Chapula J, Salinas-Stefanon E, Duff HJ y Giles WR.** *Quinidine-induced open channel block of K<sup>+</sup> current in rat ventricle.* Br J Pharmacol. 1995;115(2):335-343.
- Combet C, Blanchet C, Geourjon C y Deléage G.** *NPS@: network protein sequence analysis.* Trends Biochem Sci. 2000;25(3):147-150.
- Cruz SL, Orta-Salazar G, Gauthereau MY, Millan-Perez Peña L, Salinas-Stefanón EM.** *Inhibition of cardiac sodium currents by toluene exposure.* Br J Pharmacol. 2003;140(4):653-660.
- Cummins TR, Sheets PL, Waxman SG.** *The roles of sodium channels in nociception: Implications for mechanisms of pain.* Pain. 2007;131(3):243-257.
- Dassault Systèmes.** *Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017.* 2016.
- Davies TG, Field LM, Usherwood PN y Williamson MS.** *DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels.* IUBMB Life. 2007;59(3):151-162.
- Dechraoui MY, Naar J, Pauillac S y Legrand AM.** *Ciguatoxins and brevetoxins, neurotoxic polyether compounds active on sodium channels.* Toxicon. 1999;37(1):125-143.
- Denac H, Mevissen M y Scholtysik G.** *Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2000;362(6):453-479.
- Dib-Hajj SD, Cummins TR, Black JA y Waxman SG.** *Sodium channels in normal and pathological pain.* Annu Rev Neurosci. 2010;33:325-347.
- Dorn A, Vippagunta SR, Matile H, Jaquet C, Vennerstrom JL y Ridley RG.** *An assessment of drug-haematin binding as a mechanism for inhibition of haematin polymerisation by quinoline antimalarials.* Biochem Pharmacol. 1998;55(6):727-736.
- Drozdetskiy A, Cole C, Procter J y Barton GJ.** *JPred4: a protein secondary structure prediction server.* Nucleic Acids Res. 2015;43(W1):W389-394.
- Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, et al.** *Nomenclature of voltage-gated calcium channels.* Neuron. 2000;25:533-535.
- Faelber K, Kirchhofer D, Presta L, Kelley RF y Muller YA.** *The 1.85 Å resolution crystal structures of tissue factor in complex with humanized Fab D3h44 and of free humanized Fab D3h44: revisiting the solvation of antigen combining sites.* J Mol Biol. 2001;313(1):83-97.
- Featherstone DE, Richmond JE y Ruben PC.** *Interaction between fast and slow inactivation in Skm1 sodium channels.* Biophys J. 1996;71(6):3098-3109.
- Foley M y Tilley L.** *Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents.* Pharmacol Ther. 1998;79(1):55-87.
- Fozzard HA y Hanck DA.** *Structure and function of voltage-dependent sodium channels: comparison of brain II and cardiac isoforms.* Physiol Rev. 1996;76(3):887-926.

- Fozzard HA y Lipkind GM.** The tetrodotoxin binding site is within the outer vestibule of the sodium channel. *Mar Drugs*. 2010;8(2):219-234.
- Fozzard HA, Sheets MF y Hanck DA.** *The sodium channel as a target for local anesthetic drugs.* *Front Pharmacol*. 2011;1;2:68.
- Gargus JJ.** *Unraveling monogenic channelopathies and their implications for complex polygenic disease.* *Am J Hum Genet*. 2003;72(4):785-803.
- Giao PT y de Vries PJ.** *Pharmacokinetic interactions of antimalarial agents.* *Clin Pharmacokinet*. 2001;40(5):343-373.
- Gloria-Andrade B.** *Efecto del anillo quinolínico sobre la corriente rectificante de entrada.* Tesis maestría, 2001.
- Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F y Catterall WA.** *Nomenclature of voltage-gated sodium channels.* *Neuron*. 2000;28(2):365-368.
- Goldin AL.** *Diversity of mammalian voltage-gated sodium channels.* *Ann N Y Acad Sci*. 1999;868:38-50.
- Goldin AL.** *Evolution of voltage-gated Na(+) channels.* *J Exp Biol*. 2002;205(5):575-584.
- Goldin AL.** *Resurgence of sodium channel research.* *Annu Rev Physiol*. 2001;63:871-894.
- Goodman GA, Goodman L, y Gilman A.** *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica.* Décima edición, Volumen II. Mc Graw Hill. 2003;Cap. 40:1100-1103.
- Grant AO.** *Molecular biology of sodium channels and their role in cardiac arrhythmias.* *Am J Med*. 2001;110(4):296-305.
- Gribble FM, Davis TM, Higham CE, Clark A y Ashcroft FM.** *The antimalarial agent mefloquine inhibits ATP-sensitive K-channels.* *Br J Pharmacol*. 2000;131(4):756-760.
- Guex N y Peitsch MC.** *Swiss-PdbViewer: A Fast and Easy-to-use PDB Viewer for Macintosh and PC.* *Protein Data Bank Quarterly Newsletter*. 1996;77:7.
- Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, et al.** *International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels.* *Pharmacol Rev*. 2005;57:473-508.
- Hanck DA y Fozzard HA.** *Voltage-gated sodium channels.* En: Chung SH, Andersen OS, Krishnamurthy V (editores) *Biological membrane ion channels: dynamics, structure and applications.* Springer Science+Business Media, LLC. 2007:219-239.
- Hanck DA, Makielski JC y Sheets MF.** *Lidocaine alters activation gating of cardiac Na channels.* *Pflugers Arch*. 2000;439(6):814-821.
- Hartzell CH.** *Overview: Channels and channel proteins.* En: *Molecular physiology and pharmacology of cardiac ion channels and transporters.* Editado por: Morad, M., Ebashi, S., Trautwein, W. And Kurachi, Y. Ed. Kluwer Academic Publishers. Boston, EUA. 1996;Cap1:3-15.
- Hayward LJ, Brown RH Jr y Cannon SC.** *Slow inactivation differs among mutant Na channels associated with myotonia and periodic paralysis.* *Biophys J*. 1997;72(3):1204-1219.
- Heinemann SH, Terlau H, Stühmer W, Imoto K y Numa S.** *Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations.* *Nature*. 1992;356(6368):441-443.
- Hetényi C y van der Spoel D.** *Efficient docking of peptides to proteins without prior knowledge of the binding site.* *Protein Sci*. 2002;11(7):1729-1737.
- Hille B.** *Ionic Channels of Excitable Membranes.* 3ra. edición Sinauer Associates, Inc. Massachussets, EUA. 2001
- Hille B.** *Na and K Channels of Axons.* En: *Ionic Channels of Excitable Membranes.* Editado por: Hille B. Ed. Sinauer Associates, Inc. Massachussets, EUA. 1992;Cap. 3:Pag. 59-82.
- Hille B.** *The pH-dependent rate of action of local anesthetics on the node of Ranvier.* *J Gen Physiol*. 1977;69(4):475-496.
- Hirschberg B, Rovner A, Lieberman M y Patlak J.** *Transfer of twelve charges is needed to open skeletal muscle Na+ channels.* *J Gen Physiol*. 1995;106(6):1053-1068.
- Hodgkin AL y Huxley AF.** *A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve.* *J Physiol*. 1952;117(4):500-544.
- Höltje HD.** *Determination of Molecular Interaction Potentials.* En: *Molecular Modeling: Basic Principles and Applications.* Editado por: Höltje DH, Wolfgang Sippl W, Rognan D, Folkers G. Wiley VCH: Weinheim, Germany. 2003.
- Humphrey W, Dalke A y Schulten K.** *VMD: visual molecular dynamics.* *J Mol Graph*. 1996;14(1):33-8, 27-28.
- Islas AA, Sánchez-Solano A, Scior T, Millan-PerezPeña L y Salinas-Stefanon EM.** *Identification of Navβ1 residues involved in the modulation of the sodium channel Nav1.4.* *PLoS One*. 2013;8(12):e81995.
- Isom LL, De Jongh KS, Patton DE, Reber BF, Offord J, Charbonneau H, Walsh K, Goldin AL y Catterall WA.** *Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel.* *Science*. 1992;256 (5058):839-842.

- Isom LL, De Jongh KS, Patton DE, Reber BF, Offord J, Charbonneau H, Walsh K, Goldin AL y Catterall WA.** *Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel.* Science. 1992;256(5058):839-842.
- Isom LL, De Jongh KS, y Catterall WA.** *Auxiliary subunits of voltage-gated ion channels.* Neuron. 1994;12(6):1183-1194.
- Isom LL.** *Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary.* Neuroscientist. 2001;7(1):42-54.
- Jacobs GH, Aikawa M, Milhous WK y Rabbege JR.** *An ultrastructural study of the effects of mefloquine on malaria parasites.* Am J Trop Med Hyg. 1987;36(1):9-14.
- Kaczmarek JA y Corry B.** *Investigating the size and dynamics of voltage-gated sodium channel fenestrations.* Channels (Austin). 2014;8(3):264-277.
- Karle JM y Karle IL.** *Crystal structure and molecular structure of mefloquine methylsulfonate monohydrate: implications for a malaria receptor.* Antimicrob Agents Chemother. 1991;35(11):2238-2245.
- Karplus M y Lavery R.** *Significance of molecular dynamics simulations for life sciences.* Isr J Chem, 2014;54:1042–1051.
- Katz AM.** *Ion channels in the cardiovascular system. Function and dysfunction.* En: *Introduction: Ion channels and cardiology-The need for bridges across a widening boundary.* Spooner PM, Brown AM, Catterall WA, Kaczorowski GJ y Strauss HC (eds). Futura Publishing Co., Armonk, NY, 1994.
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G y Sonnhammer EL.** *Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes.* J Mol Biol. 2001;305(3):567-580.
- Law V, Knox C, Djoumbou Y, Jewison T, Guo AC, Liu Y, Maciejewski A, et al.** *DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism.* Nucleic Acids Res. 2014;42(Database issue):D1091-7.
- Lazdunski M y Renaud JF.** *The action of cardiotoxins on cardiac plasma membranes.* Annu Rev Physiol. 1982;44:463-473.
- Lee S, Goodchild SJ y Ahern CA.** *Local anesthetic inhibition of a bacterial sodium channel.* J Gen Physiol. 2012b;139(6):507-516.
- Lee S, Goodchild SJ y Ahern CA.** *Molecular and functional determinants of local anesthetic inhibition of NaChBac.* Channels (Austin). 2012a;6(5):403-406.
- Leipold E, DeBie H, Zorn S, Borges A, Olivera BM, Terlau H y Heinemann SH.**  *$\delta$  conotoxins inhibit Nav channels by interfering with their voltage sensors in domain-2.* Channels (Austin). 2007;1(4):253-262.
- Li RA, Tsushima RG, Himmeldirk K, Dime DS y Backx PH.** *Local anesthetic anchoring to cardiac sodium channels. Implications into tissue-selective drug targeting.* Circ Res. 1999;85(1):88-98.
- Lipkind GM y Fozzard HA.** *A structural model of the tetrodotoxin and saxitoxin binding site of the Na<sup>+</sup> channel.* Biophys J. 1994;66(1):1-13.
- Lipkind GM y Fozzard HA.** *Molecular modeling of local anesthetic drug binding by voltage-gated sodium channels.* Mol Pharmacol. 2005;68(6):1611-1622.re
- López Antuñano FJ y G Schmunis.** *Diagnóstico de. Malaria.* Organización Panamericana de la Salud. Publicación Científica. 1988;512(5):39-50.
- López-Izquierdo A, Ponce-Balbuena D, Moreno-Galindo EG, Aréchiga-Figueroa IA, Rodríguez-Martínez et al.** *The antimalarial drug mefloquine inhibits cardiac inward rectifier K<sup>+</sup> channels: evidence for interference in PIP<sub>2</sub>-channel interaction.* J Cardiovasc Pharmacol. 2011 Apr;57(4):407-415.
- Maier JK y Labute P.** *Assessment of fully automated antibody homology modeling protocols in molecular operating environment.* Proteins. 2014;82(8):1599-1610.
- Makielski JC, Limberis J, Fan Z y Kyle JW.** *Intrinsic lidocaine affinity for Na channels expressed in Xenopus oocytes depends on alpha (hH1 vs. rSkM1) and beta 1 subunits.* Cardiovasc Res. 1999;42(2):503-509.
- Makita N, Bennett PB Jr y George AL Jr.** *Multiple domains contribute to the distinct inactivation properties of human heart and skeletal muscle Na<sup>+</sup> channels.* Circ Res. 1996;78(2):244-252.
- Mantegazza M, Curia G, Biagini G, Ragsdale DS y Avoli M.** *Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders.* Lancet Neurol. 2010;9:413–424
- Marban E, Yamagishi T y Tomaselli GF.** *Structure and function of voltage-gated sodium channels.* J Physiol. 1998;508 ( Pt 3):647-657.
- Martin LJ y Corry B.** *Locating the route of entry and binding sites of benzocaine and phenytoin in a bacterial voltage gated sodium channel.* PLoS Comput Biol. 2014;10(7):e1003688.
- Martínez ME, Scior T, Millan-Perez Peña L y Salinas ES.** *Los modelos in silico. De la infección parasitaria al modelaje computacional.* Revista Elementos. 2010;77(17):33-36.
- Martínez-Morales E.** *Interacción de la primaquina con el motivo DEKA del canal de sodio de músculo esquelético de rata Nav 1.4.* Tesis de doctorado. Instituto de Fisiología Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 2011.
- McCormick KA, Isom LL, Ragsdale D, Smith D, Scheuer T y Catterall WA.** *Molecular determinants of Na<sup>+</sup> channel function in the extracellular domain of the beta1 subunit.* J Biol Chem. 1998;273(7):3954-3962.

- McCusker EC, Bagn eris C, Naylor CE, Cole AR, D'Avanzo N, Nichols CG, Wallace BA.** *Structure of a bacterial voltage-gated sodium channel pore reveals mechanisms of opening and closing.* Nat Commun. 2012;3:1102.
- McDonald TV, Courtney KR y Clusin WT.** *Use-dependent block of single sodium channels by lidocaine in guinea pig ventricular myocytes.* Biophys J. 1989;55(6):1261-1266.
- Meller J.** *Molecular Dynamics.* Encyclopedia of Life Sciences, Nature Publishing Group. 2001: 1-8
- Methfessel C, Witzemann V, Takahashi T, Mishina M, Numa S y Sakmann B.** *Patch clamp measurements on *Xenopus laevis* oocytes: currents through endogenous channels and implanted acetylcholine receptor and sodium channels.* Pflugers Arch. 1986;407(6):577-88.
- Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS y Olson AJ.** *AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility.* J Comput Chem. 2009;30(16):2785-2791.
- Muegge I y Rarey M.** *Small Molecule Docking and Scoring.* En: *Reviews in Computational Chemistry, Vol. 17.* Editado por: Lipkowitz KB y Boyd BD. Ed. Wiley and Sons. NY EUA. 2001:Vol. 17:pag. 1-60.
- Narahashi T.** *Tetrodotoxin: a brief history.* Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2008;84(5):147-54.
- National Center for Biotechnology Information (US) NCBI.** *Entrez Sequences Help.* 2010.
- Nenov NI, Crumb WJ Jr, Pigott JD, Harrison LH Jr y Clarkson CW.** *Quinidine interactions with human atrial potassium channels: developmental aspects.* Circ Res. 1998;83(12):1224-1231.
- Nicholson GM, Little MJ y Birinyi-Strachan LC.** *Structure and function of delta-atracotoxins: lethal neurotoxins targeting the voltage-gated sodium channel.* Toxicon. 2004;43(5):587-599.
- Noda M, Ikeda T, Kayano T, Suzuki H, Takeshima H, Kurasaki M, Takahashi H y Numa S.** *Existence of distinct sodium channel messenger RNAs in rat brain.* Nature. 1986;320(6058):188-192.
- Noda M, Shimizu S, Tanabe T, Takai T, Kayano T, Ikeda T, Takahashi H, Nakayama H, Kanaoka Y, Minamino N, et al.** *Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence.* Nature. 1984;312(5990):121-127.
- Noda M, Suzuki H, Numa S y St uhmer W.** *A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II.* FEBS Lett. 1989;259(1):213-216.
- Nuss HB, Chiamvimonvat N, P erez-García MT, Tomaselli GF y Marb an E.** *Functional association of the beta 1 subunit with human cardiac (hH1) and rat skeletal muscle (mu 1) sodium channel alpha subunits expressed in *Xenopus* oocytes.* J Gen Physiol. 1995 Dec;106(6):1171-91.
- O'Reilly AO, Eberhardt E, Weidner C, Alzheimer C, Wallace BA y Lampert A.** *Bisphenol A binds to the local anesthetic receptor site to block the human cardiac sodium channel.* PLoS One. 2012;7(7):e41667.
- Orta-Salazar G, Bouchard RA, Morales-Salgado F y Salinas-Stefanon EM.** *Inhibition of cardiac Na<sup>+</sup> current by primaquine.* Br J Pharmacol. 2002;135(3):751-63.
- Orta-Salazar G.** *Mecanismo de acción de la primaquina sobre el canal de Na<sup>+</sup> Nav1.5 y Nav1.4 expresado en ovocitos de la rana *Xenopus laevis*.* Tesis de Doctorado, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 2004.
- Paiz B.** *Estudio de la expresión y caracterización in s lico de la peptidasa Fxna en *S. pombe*.* Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Lab. de Neuroendocrinología. Puebla, Mexico. 2012.
- Paiz-Candia B, Islas AA, Sánchez-Solano A, Mancilla-Simbroski C, Scior T, Millan-PerezPeña L y Salinas-Stefanon EM.** *Mefloquine inhibits voltage dependent Nav1.4 channel by overlapping the local anaesthetic binding site.* European Journal of Pharmacology. 2017;796 (2017):215-223.
- Palmer KJ, Holliday SM y Brogden RN.** *Mefloquine. A review of its antimalarial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy.* Drugs. 1993;45(3):430-475.
- Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, et al.** *The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex.* Nature. 2009;458(7242):1191-1195.
- Payandeh J, Gamal El-Din TM, Scheuer T, Zheng N, Catterall WA.** *Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states.* Nature. 2012;486(7401):135-139.
- Payandeh J, Scheuer T, Zheng N y Catterall WA.** *The crystal structure of a voltage-gated sodium channel.* Nature. 2011;475(7356):353-358.
- Pedretti A, Villa L y Vistoli G.** *VEGA--an open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using plug-in architecture and script programming.* J Comput Aided Mol Des. 2004;18(3):167-173.
- Pérez S, Vale C, Alonso E, Alfonso C, Rodríguez P, Otero P, Alfonso A, et al.** *A comparative study of the effect of ciguatoxins on voltage-dependent Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> channels in cerebellar neurons.* Chem Res Toxicol. 2011;24(4):587-596.
- Perez-Cortes EJ, Islas AA, Arevalo JP, Mancilla C, Monjaraz E, Salinas-Stefanon EM.** *Modulation of the transient outward current (I<sub>to</sub>) in rat cardiac myocytes and human Kv4.3 channels by mefloquine.* Toxicol Appl Pharmacol. 2015 Oct 15;288(2):203-212.

- Peters W. *Chemotherapy and Drug resistance in malaria*. Academic Press. London. 1970;Cap. 1:1-22.
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC y Ferrin TE. *UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis*. J Comput Chem. 2004;25(13):1605-1612.
- Pevsner J. *Bioinformatics and functional genomics, second edition*. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey. 2009.
- Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, Chipot C, et al. *Scalable molecular dynamics with NAMD*. J Comput Chem. 2005;26(16):1781-1802.
- Pundir S, Martin MJ y O'Donovan C. *UniProt Protein Knowledgebase*. Methods Mol Biol. 2017;1558:41-55.
- Qing J, Du X, Chen Y, Chan P, Li H, Wu P, et al. *Antibody-based targeting of FGFR3 in bladder carcinoma and t (4;14)-positive multiple myeloma in mice*. J Clin Invest. 2009;119(5):1216-1229.
- Quinn JC. *Complex Membrane Channel Blockade: A Unifying Hypothesis for the Prodromal and Acute Neuropsychiatric Sequelae Resulting from Exposure to the Antimalarial Drug Mefloquine*. J Parasitol Res. 2015;2015:368064.
- Ren D, Navarro B, Xu H, Yue L, Shi Q y Clapham DE. *A prokaryotic voltage-gated sodium channel*. Science 2001;294:2372-2375.
- Rodriguez-Menchaca AA, Navarro-Polanco RA, Ferrer-Villada T, Rupp J, Sachse FB, Tristani-Firouzi M y Sanchez-Chapula JA. *The molecular basis of chloroquine block of the inward rectifier Kir 2.1 channel*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008;105:1364-1368.
- Rost B, Fariselli P y Casadio R. *Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86% accuracy*. Protein Sci. 1996;5(8):1704-1718.
- Sah RL, Tsushima RG y Backx PH. *Effects of local anesthetics on Na<sup>+</sup> channels containing the equine hyperkalemic periodic paralysis mutation*. Am J Physiol. 1998;275:C389-400.
- Salinas-Stefanon EM, Martinez-Morales E, Scior TF y Millan-PerezPeña L. *A residue W756 in the P-loop segment of the sodium channel is critical for primaquine binding*. Eur J Pharmacol. 2011;663(1-3):1-8.
- Salinas-Stefanon EM, Morales-Salgado. *Inhibition of INa<sup>+</sup> current by primaquine*. Biophys. J. 1998;74:A161.
- Sánchez-Chapula JA, Salinas-Stefanon E, Torres-Jácome J, Benavides-Haro DE y Navarro-Polanco RA. *Blockade of currents by the antimalarial drug chloroquine in feline ventricular myocytes*. J Pharmacol Exp Ther. 2001;297(1):437-445.
- Sánchez-Solano A, Islas AA, Scior T, Paiz-Candia B, Millan-PerezPeña L y Salinas-Stefanon EM. *Characterization of specific allosteric effects of the Na<sup>+</sup> channel  $\beta$ 1 subunit on the Nav1.4 isoform*. Eur Biophys J. 2016.
- Schlagenhauf P, Adamcova M, Regep L, Schaerer MT y Rhein HG. *The position of mefloquine as a 21st century malaria chemoprophylaxis*. Malar J. 2010;9:357.
- Schlesinger PH, Krogstad DJ y Herwaldt BL. *Antimalarial agents: mechanisms of action*. Antimicrob Agents Chemother. 1988;32(6):793-798.
- Schmidt LH, Crosby R, Rasco J y Vaughan D. *Antimalarial activities of various 4-quinolonemethanols with special attention to WR-142,490 (mefloquine)*. Antimicrob Agents Chemother. 1978;13(6):1011-1030.
- Scholz A. *Mechanisms of (local) anaesthetics on voltage-gated sodium and other ion channels*. Br J Anaesth. 2002;89(1):52-61.
- Schreibmayer W, Lester HA y Dascal N. *Voltage clamping of Xenopus laevis oocytes utilizing agarose-cushion electrodes*. Pflugers Arch. 1994;426(5):453-458.
- Schrödinger, LLC. *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8*. 2015.
- Scior T, Paiz-Candia B, Islas AA, Sánchez-Solano A, Millan-Perez Peña L, Mancilla-Simbro C y Salinas-Stefanon EM. *Predicting a double mutant in the twilight zone of low homology modeling for the skeletal muscle voltage-gated sodium channel subunit beta-1 (Nav1.4  $\beta$ 1)*. Comput Struct Biotechnol J. 2015;13:229-240. [ doi: 10.1016/j.csbj.2015.03.005. eCollection.
- Scior TF, Islas AA, Martínez-Morales E, Cuanalo-Contreras K, Millan-Perezpeña L, Salinas-Stefanon EM. *An In-Silico Approach to Primaquine Binding to Trp756 in the External Vestibule of Sodium Channel Nav 1.4*. J of Receptor, Ligand and Channel Res. 2011;4:41-48.
- Scior TRF, Martínez-Morales E, Cruz SL y Salinas-Stefanon EM. *In silico modeling of toluene binding site in the pore of voltage-gate sodium channel*. J Receptor, Ligand Channel Res. 2009;2:1-2.
- Secretaría de Salud de México. *World Malaria Report para México (Año 2016)*. 2016.
- Shapiro L, Doyle JP, Hensley P, Colman DR y Hendrickson WA. *Crystal structure of the extracellular domain from PO, the major structural protein of peripheral nerve myelin*. Neuron. 1996;17(3):435-449.
- Shen H, Zhou Q, Pan X, Li Z, Wu J y Yan N. *Structure of a eukaryotic voltage-gated sodium channel at near-atomic resolution*. Science. 2017;355(6328).
- Slater AF y Cerami A. *Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites*. Nature. 1992;355(6356):167-169.
- Smith NE y Corry B. *Mutant bacterial sodium channels as models for local anesthetic block of eukaryotic proteins*. Channels (Austin). 2016;10(3):225-237.

- Snyders DJ, Hondeghem LM, y Bennett PB. *Mechanisms of drug-channel interactions*. En: *The heart and the cardiovascular system: scientific foundations (Segunda ed.)*. Editado por: Fozzard HA, Haber E. Ed. Raven Press, Ltd. NY EUA. 1992;pag. 2165-2193.
- Song JH, Nagata K, Tatebayashi H y Narahashi T. *Interactions of tetramethrin, fenvalerate and DDT at the sodium channel in rat dorsal root ganglion neurons*. Brain Res. 1996;708(1-2):29-37.
- Spampanato J, Kearney JA, de Haan G, McEwen DP, Escayg A, Aradi I, MacDonald BT, Levin SI, Soltesz I, Benna P, Montalenti E, Isom LL, Goldin AL y Meisler MH. *A novel epilepsy mutation in the sodium channel SCN1A identifies a cytoplasmic domain for beta subunit interaction*. J Neurosci. 2004;24(44):10022-10034.
- Stephan MM, Potts JF y Agnew WS. *The microl skeletal muscle sodium channel: mutation E403Q eliminates sensitivity to tetrodotoxin but not to mu-conotoxins GIIIA and GIIIB*. J Membr Biol. 1994;137(1):1-8.
- Stevens M, Peigneur S y Tytgat J. *Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels*. Front Pharmacol. 2011;2:71.
- Strichartz GR y Berde CB. *Anestésicos locales*. En: *Anestesia (4ª ed)*. Editado por: Miller RD. Ed. Doyma. Barcelona España. 1998:Cap. 1; Pag 475-505: Ediciones Doyma, 1998: I: 475-505.
- Sunami A, Glaaser IW y Fozzard HA. *A critical residue for isoform difference in tetrodotoxin affinity is a molecular determinant of the external access path for local anesthetics in the cardiac sodium channel*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(5):2326-2331.
- Terlau H, Heinemann SH, Stühmer W, Pusch M, Conti F, Imoto K y Numa S. *Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II*. FEBS Lett. 1991;293(1-2):93-96.
- Tikhonov DB y Zhorov BS. *Sodium channel activators: model of binding inside the pore and a possible mechanism of action*. FEBS Lett. 2005;579(20):4207-4212.
- Tomaselli GF. *Molecular basis of permeation in voltage-gated ion channels*. En: *Molecular physiology and pharmacology of cardiac ion channels and transporters*. Editado por: Morad M, Ebashi S, Trautwein W y Kurachi Y. Ed. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston EUA. 1996;Cap. 1:pag. 3-15.
- Traebert M, Dumotier B, Meister L, Hoffmann P, Dominguez-Estevez M y Suter W. *Inhibition of hERG K<sup>+</sup> currents by antimalarial drugs in stably transfected HEK293 cells*. Eur J Pharmacol. 2004;484(1):41-48.
- Trainer VL, Baden DG y Catterall WA. *Identification of peptide components of the brevetoxin receptor site of rat brain sodium channels*. J Biol Chem. 1994;269(31):19904-19909.
- Trainer VL, McPhee JC, Boutelet-Bochan H, Baker C, Scheuer T, Babin D, et al. *High affinity binding of pyrethroids to the alpha subunit of brain sodium channels*. Mol Pharmacol. 1997;51(4):651-7.
- Trott O y Olson AJ. *AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading*. J Comput Chem. 2010 Jan 30;31(2):455-461.
- Tsang SY, Tsushima RG, Tomaselli GF, Li RA y Backx PH. *A multifunctional aromatic residue in the external pore vestibule of Na<sup>+</sup> channels contributes to the local anesthetic receptor*. Mol Pharmacol. 2005;67(2):424-434.
- Tsushima RG, Li RA y Backx PH. *P-loop flexibility in Na<sup>+</sup> channel pores revealed by single- and double-cysteine replacements*. J Gen Physiol. 1997;110(1):59-72.
- Uebachs M, Opitz T, Royeck M, Dickhof G, Horstmann MT, Isom LL y Beck H. *Efficacy loss of the anticonvulsant carbamazepine in mice lacking sodium channel beta subunits via paradoxical effects on persistent sodium currents*. J Neurosci. 2010 Jun 23;30(25):8489-501. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1534-10.2010.
- Ulbricht W. *Sodium channel inactivation: molecular determinants and modulation*. Physiol Rev. 2005;85(4):1271-1301.
- Ultsch MH, Wiesmann C, Simmons LC, Henrich J, Yang M, et al. *Crystal structures of the neurotrophin-binding domain of TrkA, TrkB and TrkC*. J Mol Biol. 1999;290(1):149-159.
- Vilin YY, Fujimoto E y Ruben PC. *A single residue differentiates between human cardiac and skeletal muscle Na<sup>+</sup> channel slow inactivation*. Biophys J. 2001;80(5):2221-2230.
- Wang GK y Strichartz GR. *State-Dependent Inhibition of Sodium Channels by Local Anesthetics: A 40-Year Evolution*. Biochem (Mosc) Suppl Ser A Membr Cell Biol. 2012;6(2):120-127.
- Wang GK, Quan C y Wang SY. *Local anesthetic block of batrachotoxin-resistant muscle Na<sup>+</sup> channels*. Mol Pharmacol. 1998;54(2):389-396.
- Wang SY y Wang GK. *A mutation in segment I-S6 alters slow inactivation of sodium channels*. Biophys J. 1997;72(4):1633-1640.
- Wang SY y Wang GK. *Point mutations in segment I-S6 render voltage-gated Na<sup>+</sup> channels resistant to batrachotoxin*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(5):2653-2668.
- Wanke E, Zaharenko AJ, Redaelli E y Schiavon E. *Actions of sea anemone type 1 neurotoxins on voltage-gated sodium channel isoforms*. Toxicon. 2009;54(8):1102-1111.

- Webb B y Sali A.** *Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER.* Curr Protoc Protein Sci. 2016;1;86:2.9.1-2.9.37.
- White NJ.** *Cardiotoxicity of antimalarial drugs.* Lancet Infect Dis. 2007;7(8):549-558.
- Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, Appel RD y Hochstrasser DF.** *Protein identification and analysis tools in the ExPASy server.* Methods Mol Biol. 1999;112:531-552.
- Winstanley P.** *Mefloquine: the benefits outweigh the risks.* Br J Clin Pharmacol. 1996;42(4):411-413.
- Wright SN, Wang SY, Kallen RG y Wang GK.** *Differences in steady-state inactivation between Na channel isoforms affect local anesthetic binding affinity.* Biophys J. 1997;73(2):779-88.
- Yamagishi T, Li RA, Hsu K, Marbán E y Tomaselli GF.** *Molecular architecture of the voltage-dependent Na channel: functional evidence for alpha helices in the pore.* J Gen Physiol. 2001;118(2):171-182.
- Yarov-Yarovoy V, Baker D y Catterall WA.** *Voltage sensor conformations in the open and closed states in ROSETTA structural models of K(+) channels.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(19):7292-7297.
- Yarov-Yarovoy V, DeCaen PG, Westenbroek RE, Pan CY, Scheuer T, Baker D y Catterall WA.** *Structural basis for gating charge movement in the voltage sensor of a sodium channel.* Proc Natl Acad Sci USA. 2012;109(2):E93-102.
- Yu FH y Catterall WA.** *Overview of the voltage-gated sodium channel family.* Genome Biol. 2003;4(3):207.
- Zhang JZ, Yarov-Yarovoy V, Scheuer T, Karbat I, Cohen L, Gordon D, Gurevitz M y Catterall WA.** *Structure-function map of the receptor site for  $\beta$ -scorpion toxins in domain II of voltage-gated sodium channels.* J Biol Chem. 2011;286(38):33641-51.
- Zhang X, Ren W, DeCaen P, Yan C, Tao X, Tang L, et al.** *Crystal structure of an orthologue of the NaChBac voltage-gated sodium channel.* Nature 2012;486:130-134.
- Zidovetzki R, Sherman IW, Maguire PA y De Boeck H.** *A nuclear magnetic resonance study of the interactions of the antimalarials chloroquine, quinacrine, quinine and mefloquine with lipids extracted from normal human erythrocytes.* Mol Biochem Parasitol. 1990;38(1):33-39.

### 13. PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

#### 13.1. Artículos arbitrados e indexados

- **Bertin Paiz-Candia, Angel A. Islas, Alfredo Sánchez-Solano, Claudia Mancilla-Simbros, Thomas Scior, Lourdes Millan-PerezPeña and Eduardo M. Salinas-Stefanon.** Mefloquine inhibits voltage dependent Nav1.4 channel by overlapping the local anaesthetic binding site. *European Journal of Pharmacology*. 2017;796 (2017):215–223.
- **Alfredo Sánchez-Solano, Angel A. Islas, Thomas Scior, Bertin Paiz-Candia, Lourdes Millan-PerezPeña y Eduardo M. Salinas-Stefanon.** Characterization of specific allosteric effects of the Na<sup>+</sup> channel  $\beta$ 1 subunit on the Nav1.4 isoform. *Eur Biophys J*. 2016. doi:10.1007/s00249-016-1193-3.
- **Scior T, Paiz-Candia B, Islas ÁA, Sánchez-Solano A, Millan-Perez Peña L, Mancilla-Simbros C, Salinas-Stefanon EM.** Predicting a double mutant in the twilight zone of low homology modeling for the skeletal muscle voltage-gated sodium channel subunit beta-1 (Nav1.4  $\beta$ 1). *Comput Struct Biotechnol J*. 2015;13:229-240. [ doi: 10.1016/j.csbj.2015.03.005. eCollection.

#### 13.2. Comunicaciones en congresos internacionales

- **Paiz-Candia B, Moreno-Moreno LG, Scior T, Millan-PerezPeña L y Salinas-Estefanon EM.** Acción del antimalárico mefloquina sobre el canal de sodio del músculo esquelético. 2° Simposium Internacional avalado por la Sociedad Europea de Cardiología "Fronteras en Investigación Cardiovascular", celebrado 24 y 25 de noviembre en Huatulco, Oaxaca, México
- **Paiz B; Scior T; Islas A; Millán L; Salinas-Stefanon E.** Modeling the interaction between the  $\alpha$  and  $\beta$ 1 subunits of the sodium channel Nav 1.4."4 Congreso de la Rama de Físicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas de la SMB" y "3rd USA-Mexico Workshop in Biological Chemistry: Protein Folding, Dynamics and Function". 5 al 9 de Noviembre 2012. Guanajuato, Gto., México.

#### 13.3. Comunicaciones en congresos nacionales

- **Bertin Paiz Candia, Thomas Scior Jung, Eduardo Salinas Stefanon.** Estudio de la interacción de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ 1 de los canales Nav1.4. XX Simposio Interno del Posgrado de Ciencias químicas. 12-15 de Octubre 2015. Puebla, Pue., México.
- **Paiz Candia, Bertin; Islas Navarrete, Ángel Adonai; Sánchez Solano, Alfredo; Millán Pérez-Peña, Lourdes; Scior, Thomas; Salinas Stefanón, Eduardo.** Búsqueda de la interacción de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ 1 del canal de sodio 1.4 dependiente de voltaje. LVIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. 6-10 de Septiembre de 2015. San Miguel de Allende, Gto. México.
- **Scior, Thomas; Paiz Candia, Bertin; Islas Navarrete, Ángel Adonai; Sánchez Solano, Alfredo; Millán Pérez-Peña, Lourdes; Salinas Stefanón, Eduardo.** Aproximación in silico del mecanismo de interacción entre NavB1 y canal de sodio 1.4. XLVII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas" Celebrado del 26 al 29 de octubre del 2014 en Puerto Vallarta, Jalisco México.
- **Paiz-Candia, Bertin; Scior, Thomas; Millán Pérez-Peña, Lourdes; Salinas-Stefanon.** Efecto farmacológico del antimalárico mefloquina sobre las corrientes del canal de sodio Nav 1.4. LVII Congreso de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. 31 de agosto al 4 de septiembre de 2014. Oaxaca, Oax. México.
- **Paiz B; Scior T; Islas A; Millan L; Salinas E.** Mecanismo de acción de las aminoquinolinas en los canales de sodio voltaje-dependientes. 40 Aniversario ICUAP y el V ENCUENTRO NACIONAL DE CIENCIAS "LUIS RIVERA TERRAZAS". 1 al 5 de Septiembre 2014. Puebla, Pue. México.

- **Paiz B, Scior T.** Mecanismo de acción de las aminoquinolinas en los canales de sodio voltaje-dependientes. XVIII Simposio Interno del posgrado. 23 al 25 Octubre de 2013. Puebla, Pue. México.



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ejphar](http://www.elsevier.com/locate/ejphar)

Full length article

## Mefloquine inhibits voltage dependent Na<sub>v</sub>1.4 channel by overlapping the local anaesthetic binding site



Bertin Paiz-Candia<sup>b,2,1</sup>, Angel A. Islas<sup>a,b,1</sup>, Alfredo Sánchez-Solano<sup>a,2</sup>, Claudia Mancilla-Simbro<sup>a</sup>, Thomas Scior<sup>b</sup>, Lourdes Millan-PerezPeña<sup>c</sup>, Eduardo M. Salinas-Stefanon<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Biofísica, Instituto de Fisiología, Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México

<sup>b</sup> Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Puebla, 14 Sur 6301, CU, San Manuel, Puebla, México

<sup>c</sup> Centro de Química, Instituto de Ciencias, Universidad Autónoma de Puebla, 14 Sur 6301, CU, San Manuel, Puebla, México

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Docking  
Local anaesthetic  
Mefloquine  
Oocytes  
Selectivity filter

### ABSTRACT

Mefloquine constitutes a multitarget antimalaric that inhibits cation currents. However, the effect and the binding site of this compound on Na<sup>+</sup> channels is unknown. To address the mechanism of action of mefloquine, we employed two-electrode voltage clamp recordings on *Xenopus laevis* oocytes, site-directed mutagenesis of the rat Na<sup>+</sup> channel, and a combined *in silico* approach using Molecular Dynamics and docking protocols. We found that mefloquine: i) inhibited Na<sub>v</sub>1.4 currents (IC<sub>50</sub> = 60 μM), ii) significantly delayed fast inactivation but did not affect recovery from inactivation, iii) markedly shifted steady-state inactivation curve to more hyperpolarized potentials. The presence of the β1 subunit significantly reduced mefloquine potency, but the drug induced a significant frequency-independent rundown upon repetitive depolarisations. Computational and experimental results indicate that mefloquine overlaps the local anaesthetic binding site by docking at a hydrophobic cavity between domains DIII and DIV that communicates the local anaesthetic binding site with the selectivity filter. This is supported by the fact that mefloquine potency significantly decreased on mutant Na<sub>v</sub>1.4 channel F1579A and significantly increased on K1237S channels. *In silico* this compound docked above F1579 forming stable π-π interactions with this residue. We provide structure-activity insights into how cationic amphiphilic compounds may exert inhibitory effects by docking between the local anaesthetic binding site and the selectivity filter of a mammalian Na<sup>+</sup> channel. Our proposed synergistic cycle of experimental and computational studies may be useful for elucidating binding sites of other drugs, thereby saving *in vitro* and *in silico* resources.

### 1. Introduction

An essential process of every excitable cell is the fast gating of voltage-dependent sodium (Na<sup>+</sup>) channels (Na<sub>v</sub>s), in which an inward ion flow initiates depolarisation of the action potential (Catterall, 2012). Compounds that reversibly block Na<sub>v</sub>s interfere with electrical signal generation and transmission, and have potential applications in the treatment of chronic pain and pathological conditions associated with hyperexcitability (Catterall and Swanson, 2015). Local anaesthetics (LAs), anticonvulsants, antiarrhythmics and antidepressants share this general action mechanism. Differences in their modulatory effects, including their affinities to open, resting and inactivated states, are critical to their unique therapeutic roles and side effects (Wang and

Strichartz, 2012); however, the local anaesthetic binding site (LABS) is highly conserved among the 9 mammalian isoforms of voltage-dependent sodium channels (Wang and Strichartz, 2012) (Supplementary Fig. S1), hence we decided to focus on the very well-studied Na<sub>v</sub>1.4 isoform.

Quinoline-derived compounds, such as chloroquine, primaquine and mefloquine, inhibit voltage-dependent ionic currents (Lopez-Izquierdo et al., 2011; Orta-Salazar et al., 2002; Perez-Cortes et al., 2015; Rodriguez-Menchaca et al., 2008; Sanchez-Chapula et al., 2001). We previously demonstrated that primaquine inhibits Na<sup>+</sup> currents (I<sub>Na</sub>), combining site-directed mutagenesis with voltage-clamp methods; we examined the binding site of primaquine while blocking currents from the mammalian Na<sub>v</sub>1.4 channel. We ruled out the

\* Correspondence to: Instituto de Fisiología, Universidad Autónoma de Puebla, 14 Sur 6301, CU, San Manuel, postcode: 72570, Puebla, México.

E-mail addresses: bertin.paiz@gmail.com (B. Paiz-Candia), angelislas@gmail.com (A.A. Islas), claudia.mancilla@gmail.com (C. Mancilla-Simbro), tscior@gmail.com (T. Scior), lourdes.millan@correo.buap.mx (L. Millan-PerezPeña), eduardo.salinas@correo.buap.mx (E.M. Salinas-Stefanon).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> Submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of PhD

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.01.002>

Received 8 August 2016; Received in revised form 21 December 2016; Accepted 2 January 2017

Available online 03 January 2017

0014-2999/ © 2017 Published by Elsevier B.V.

Eur Biophys J  
DOI 10.1007/s00249-016-1193-3

ORIGINAL ARTICLE



CrossMark

## Characterization of specific allosteric effects of the Na<sup>+</sup> channel β1 subunit on the Na<sub>v</sub>1.4 isoform

Alfredo Sánchez-Solano<sup>1</sup> · Angel A. Islas<sup>1,2</sup> · Thomas Scior<sup>2</sup> · Bertin Paiz-Candia<sup>2</sup> · Lourdes Millan-PerezPeña<sup>3</sup> · Eduardo M. Salinas-Stefanon<sup>1</sup>

Received: 31 August 2016 / Revised: 23 November 2016 / Accepted: 30 November 2016  
© European Biophysical Societies' Association 2016

**Abstract** The mechanism of inactivation of mammalian voltage-gated Na<sup>+</sup> channels involves transient interactions between intracellular domains resulting in direct pore occlusion by the IFM motif and concomitant extracellular interactions with the β1 subunit. Na<sub>v</sub>β1 subunits constitute single-pass transmembrane proteins that form protein–protein associations with pore-forming α subunits to allosterically modulate the Na<sup>+</sup> influx into the cell during the action potential of every excitable cell in vertebrates. Here, we explored the role of the intracellular IFM motif of rNa<sub>v</sub>1.4 (skeletal muscle isoform of the rat Na<sup>+</sup> channel) on the α-β1 functional interaction and showed for the first time that the modulation of β1 is independent of the IFM motif. We found that: (1) Na<sub>v</sub>1.4 channels that lack the IFM inactivation particle can undergo a “C-type-like inactivation” albeit in an ultraslow gating mode; (2) β1 can significantly accelerate the inactivation of Na<sub>v</sub>1.4 channels in the absence of the IFM motif. Previously, we identified two residues (T109 and N110) on the β1 subunit that disrupt the

α-β1 allosteric modulation. We further characterized the electrophysiological effects of the double alanine substitution of these residues demonstrating that it decelerates inactivation and recovery from inactivation, abolishes the modulation of steady-state inactivation and induces a current rundown upon repetitive stimulation, thus causing a general loss of function. Our results contribute to delineating the process of the mammalian Na<sup>+</sup> channel inactivation. These findings may be relevant to the design of pharmacological strategies, targeting β subunits to treat pathologies associated to Na<sup>+</sup> current dysfunction.

**Keywords** Sodium · Inactivation · Allosteric · Mutant · C-type · Oocyte · Loss of function · Na<sub>v</sub>1.4 · IFM

### Introduction

The fast and efficient transmission of information among excitable cells through action potentials is initiated by the transient activation of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels (Na<sub>v</sub>s) upon membrane depolarization. The rapid inactivation (1–2 ms) of these channels is essential to preserve the transmembrane Na<sup>+</sup> gradient and to ensure the availability of channels for reactivation and high frequency action potential firing (Catterall 2012). Na<sup>+</sup> channel accessory β subunits are absent in invertebrates but are orthologs in teleost fish, amphibians, birds and mammals. They are believed to have originated before the divergence of teleosts and tetrapods and may have played a role in the electric signal specialization and diversification of the first vertebrates (Chopra et al. 2007). The β1 subunit modulates the Na<sup>+</sup> current by accelerating the inactivation and recovery from inactivation and modifying the voltage dependence of gating in mammalian Na<sub>v</sub>s, including the skeletal muscle

A. Sanchez-Solano and A. A. Islas contribute equally to this study.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00249-016-1193-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Eduardo M. Salinas-Stefanon  
eduardo.salinas@correo.buap.mx

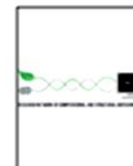
<sup>1</sup> Laboratorio de Biofísica, Instituto de Fisiología, Universidad Autónoma de Puebla, 14 Sur No. 6301 C.U., 72570 Puebla, Pue, Mexico

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico

<sup>3</sup> Centro de Química, Instituto de Ciencias, Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico

Published online: 23 December 2016

Springer



## Predicting a double mutant in the twilight zone of low homology modeling for the skeletal muscle voltage-gated sodium channel subunit beta-1 ( $\text{Na}_v1.4 \beta 1$ )

Thomas Scior<sup>a</sup>, Bertin Paiz-Candia<sup>a</sup>, Ángel A. Islas<sup>b</sup>, Alfredo Sánchez-Solano<sup>b</sup>, Lourdes Millan-Perez Peña<sup>c</sup>, Claudia Mancilla-Simbro<sup>b</sup>, Eduardo M. Salinas-Stefanon<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico

<sup>b</sup> Laboratorio de Biofísica, Instituto de Fisiología, Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico

<sup>c</sup> Centro de Química, Instituto de Ciencias, Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 1 December 2014

Received in revised form 18 March 2015

Accepted 21 March 2015

Available online 27 March 2015

#### Keywords:

Ig-like

CDR1

MD-2

Patch-clamp

Site-directed mutagenesis

Analogy modeling

### ABSTRACT

The molecular structure modeling of the  $\beta 1$  subunit of the skeletal muscle voltage-gated sodium channel ( $\text{Na}_v1.4$ ) was carried out in the twilight zone of very low homology. Structural significance can *per se* be confounded with random sequence similarities. Hence, we combined (i) not automated computational modeling of weakly homologous 3D templates, some with interfaces to analogous structures to the pore-bearing  $\text{Na}_v1.4$   $\alpha$  subunit with (ii) site-directed mutagenesis (SDM), as well as (iii) electrophysiological experiments to study the structure and function of the  $\beta 1$  subunit. Despite the distant phylogenetic relationships, we found a 3D-template to identify two adjacent amino acids leading to the long-awaited loss of function (inactivation) of  $\text{Na}_v1.4$  channels. This mutant type (T109A, N110A, herein called TANA) was expressed and tested on cells of hamster ovary (CHO). The present electrophysiological results showed that the double alanine substitution TANA disrupted channel inactivation as if the  $\beta 1$  subunit would not be in complex with the  $\alpha$  subunit. Exhaustive and unbiased sampling of “all  $\beta$  proteins” (Ig-like, Ig) resulted in a plethora of 3D templates which were compared to the target secondary structure prediction. The location of TANA was made possible thanks to another “all  $\beta$  protein” structure in complex with an irreversible bound protein as well as a reversible protein–protein interface (our “Rosetta Stone” effect). This finding coincides with our electrophysiological data (disrupted  $\beta 1$ -like voltage dependence) and it is safe to utter that the  $\text{Na}_v1.4 \alpha/\beta 1$  interface is likely to be of reversible nature.

© 2015 Scior et al. Published by Elsevier B.V. on behalf of the Research Network of Computational and Structural Biotechnology. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

### 1.1. The function and structure of $\text{Na}^+$ channels

Ion channels are a ubiquitous class of membrane-spanning proteins. They accomplish electrochemical functions and specifically regulate ion movements ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$  cations or  $\text{Cl}^-$  anions) through their gating mechanism, understood as the transition between open active, inactive and closed states. A typical channel is a multimeric protein complex. It is assembled from a pore-forming  $\alpha$  subunit that is often assisted by other subunits labeled  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , etc. [1] Mammalian  $\text{Na}^+$  channels are heterotrimeric, composed of one central  $\alpha$  subunit of four variable repeat units or domains (DI to DIV) and two or more auxiliary  $\beta$  subunits.

Nine  $\alpha$  isoforms and 4  $\beta$  isoforms have been described for this class [2]. For many ion channels ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ , GABA, and NMDA) subunit cooperativity is paralleled by small molecule modulation through interaction sites other than the pore region with its outer and inner vestibules. Such ligand binding sites are often referred to as allosteric, modulatory or regulatory [3].

### 1.2. The $\text{Na}^+$ channel $\beta 1$ subunit ( $\text{Na}_v\beta 1$ )

$\text{Na}^+$  channel  $\beta$  subunits were functionally characterized as channel gating modulators and channel protein expression regulators at the plasma membrane level and were structurally identified as “cell adhesion molecules” [4,5]. The  $\beta$  subunit modulation confers differential activity depending on the channel isoform and tissue type where the protein complex is expressed. The primary sequence of the sodium channel  $\beta$  subunit ( $\text{Na}_v\beta 1$ ) is the same for all  $\alpha$  subunit isoforms [6]. The presence of  $\text{Na}_v\beta 1$  is a necessary but not sufficient prerequisite to modulate channel activity. The extracellular domain of  $\beta 1$  is necessary

Abbreviations: MD-2, myeloid differentiation factor 2 (MD-2); SDM, site-directed mutagenesis;  $\text{Na}_v1.4$ , skeletal muscle voltage-gated sodium channel; TLR4, Toll-like receptor type 4; Trk, tyrosine receptor.

E-mail addresses: [tsnior@gmail.com](mailto:tsnior@gmail.com), [thomas.scior@correo.bupa.mx](mailto:thomas.scior@correo.bupa.mx) (T. Scior).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.csbj.2015.03.005>

2001-0370/© 2015 Scior et al. Published by Elsevier B.V. on behalf of the Research Network of Computational and Structural Biotechnology. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 14. APÉNDICE A. Condiciones para la mutagénesis sitio dirigida

Las mutaciones probadas en este trabajo fueron realizadas en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular del Centro de Química-ICUAP por el Dr Alfredo Sánchez Solano con la dirección de la Dra. Lourdes Millán Pérez Peña. En esta sección se muestra la metodología llevada a cabo.

### 14.1. Mutagénesis sitio dirigida específica

Para la mutagénesis sitio dirigida se utilizó el kit QuikChange II XL site-directed mutagénesis (No. 200521 Agilent Technologies Inc.) siguiéndose las especificaciones marcadas por el proveedor.

### 14.2. Diseño de los oligonucleótidos con las respectivas mutaciones

Para la generación de los oligonucleótidos utilizados para las mutaciones se tomaron en consideración las siguientes características: un tamaño de entre 25 y 45 nucleótidos, un promedio de 10 a 15 bases a cada lado de la mutación de interés, una temperatura de fusión ( $T_m$ ) de hasta 78°C, un porcentaje óptimo de 40 % en contenido de GC (Guanina-Citosina), además que el oligonucleótido termine en una o más bases G o C.

Para el diseño se utilizó la secuencia de ARN<sub>m</sub> del canal rNav1.4 (NCBI-M26643), el cual estuvo clonado en el vector pGW1H. La valoración de los oligonucleótidos se realizó en el *Programa Integrated DNA Technologies* ([www.idtdna.com/calc/analyzer](http://www.idtdna.com/calc/analyzer)) el cual muestra los valores de % GC,  $T_m$  y horquillas formadas entre otras características.

### 14.3. Mutagénesis sitio dirigida

El procedimiento para la mutagénesis sitio dirigida se basó en una reacción de PCR usando una ADN polimerasa de alta potencia para esta metodología se siguieron los siguientes pasos:

i) *PCR*: en donde se llevó a cabo la mutagénesis del plásmido pGW1H de acuerdo a las siguientes condiciones (Tabla A.1 y Tabla A.2).

ii) *Digestión con la enzima DpnI*: Para eliminar las cadenas molde metiladas se utilizó 1.5  $\mu$ l de *DpnI* (37°C/2 h).

iii) *Transformación*: Para obtener una gran cantidad de plásmido se transformaron las células competentes One Shot® TOP10 E. coli (ThermoFisher Scientific – Cat. 4040–10) con los plásmidos mutados utilizando buffer TCM que contenía 6.7 mM Tris-HCl pH 7.6, 6.7 mM CaCl<sub>2</sub>

Después se mezcló el contenido y se colocó en hielo por 40 min. Transcurrido el tiempo, se hizo 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 y se agregaron 500 µL de medio LB Broth líquido pH 7.0 (SIGMA – Cat. L3022) sin ampicilina y se incubaron a 37°C por 1 h con agitación (225-250 rpm).

Terminada la incubación, se centrifugaron los tubos a 6,000 rpm por 5 minutos. Se eliminaron 600 µL del sobrenadante y con el resto, se resuspendió el botón de bacterias OneShot® 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 12 horas.

**Tabla A.1.** Condiciones de la mezcla de mutagénesis.

Control PCR		Muestra PCR	
Reactivo	(µl)	Reactivo	(µl)
Buffer 10x	5	Buffer 10x	5
ADN Plasmídico	2	pGW1H /  J1 (10 ng/ML)	X
Primer 1	1.25	Forward (100 ng/ML)	X
Primer 2	1.25	Reverse (100 ng/ML)	X
dNTP mix	1	dNTP mix	1
Quik solution	3	Quik solution	3
H <sub>2</sub> O esteril	36.5	H <sub>2</sub> O esteril	X
Polimerasa pfu Turbo	1	Polimerasa pfu Turbo	1
Volumen total	50	Volumen total	50

**Tabla A.2.** Condiciones del termociclador.

Segmento	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95 °C	1 minuto
2	18	95°C	50 segundos
		60°C	50 segundos
		68°C	15 minutos
3	1	68°C	7 minutos

#### 14.4. Obtención de ADN Plásmido por ebullición (mini prep)

Finalizado el tiempo de incubación se tomaron las colonias presentes y se incubaron en 5 ml de medio de cultivo LB+ampicilina (100 µg/ml) fresco a 37°C, durante 20 h y con agitación. Posteriormente 2 ml fueron utilizados para obtener las células por centrifugación (5000 rpm/5 min), a estas células se les agregaron 300 µL de STET (4 % Sacarosa, 5 % Triton 100X, 50 mM EDTA y 50 mM Tris-HCl pH 7.4) y 50 ml de lisozima (10 mg/ml). La mezcla fue calentada en baño maría por 1 hora, se centrifugó la muestra (12000 rpm/10 min/temperatura ambiente). Se eliminan los restos de células con un palillo estéril y se resuspendió en 300 µl de isopropanol; posteriormente se lavó con 500 µl de etanol al 70 % centrifugando en cada caso a 12000 rpm/ 5 min. Finalmente, se resuspendió el ADN plasmídico en 300 µl de TE (pH 8.0). Se valoró su concentración y pureza por densitometría y su identidad e integridad fueron determinadas mediante su patrón de restricción.

#### 14.5. Propagación de los plásmidos mutados

Una vez establecida la identidad de los plásmidos, 1 ml del resto del cultivo no utilizado para la mini prep, se pre-cultiva agregando 2 ml de medio LB+ampicilina (100 µg/ml) fresco a 37°C, durante 20 h y en agitación. Después se utiliza 1.5 ml de cultivo para sembrar dos matraces con 100 ml de medio LB+ampicilina (100 µg/ml) incubando a 37°C por 20 h y en agitación.

#### 14.6. Extracción del ADN plasmídico

Pasado el tiempo de incubación se toma una muestra de 1.5 ml del cultivo se le agrega 150 µl de glicerol estéril y se guarda a -80°C.

El resto del cultivo se utilizó para extraer el ADN plasmídico con el kit *Hi Speed Plasmid Midi* (No. 12643, QIAGEN). Los 200 ml se repartieron equitativamente en 6 tubos y se centrifugaron (5000 rpm/ 6 min). Posteriormente, las 6 pastillas se re-suspenden con 6 ml de buffer de re-suspensión y se vacían a un sólo tubo, agregándoles 6 ml de buffer de lisis, mezclándose hasta obtener un color azul y dejando reposar por 5 min a temperatura ambiente.

A continuación, se agregan 6 ml de buffer neutralizante mezclando por inversión hasta ver que desaparece el color azul. Esta mezcla se transfirió a una jeringa con un filtro y se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente. Durante este tiempo se equilibra la columna con 4 ml de buffer de equilibrio QBT; y el filtrado se vació lentamente dentro de la columna, una vez que todo filtrado ha pasado por la columna, se lava con 20 ml de buffer QC.

Más tarde se recuperó el ADN de la columna lavando con 5 ml de buffer de elusión QF y se agrega 3.5 ml de isopropanol, agitando con vortex e incubando la muestra por 5 min a temperatura ambiente.

La mezcla se vuelve a colocar en la jeringa pero esta vez se utilizara el filtro precipitador QIA Midi del Kit, se lava el filtro con alcohol al 70 % y se introducen aire para secar el filtro.

Por último, se recuperó el ADN Plasmídico con 500µl buffer TE, pasando por el filtro dos volúmenes. Se valoró su concentración y pureza por densitometría y su identidad mediante secuenciación.

#### **14.7. Verificación de las mutaciones**

Para la secuenciación se diseñaron y mandaron a sintetizar un par de oligonucleótidos, uno sentido y otro antisentido, para cada aminoácido mutado, considerando 300 bases a cada lado de la mutación. Se consideraron los siguientes parámetros para su diseño: una longitud de 25 a 30 pb, una  $T_m$  de 60°C, un porcentaje de 50 % en contenido de GC y el mínimo de horquillas posible. Estos diseños fueron evaluados en el programa *Integrated DNA Technologies* ([www.idtdna.com/calc/analyser](http://www.idtdna.com/calc/analyser)). Estos oligonucleótidos se diseñaron para obtener un fragmento entre 600 y 800 pb.

Las muestras se mandaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología, UNAM, Morelos. Una vez que se obtuvo el electroferograma, se editó mediante el programa BioEdit, y la secuencia se alineó con la secuencia del canal nativo rNav1.4, para corroborar que se había introducido la respectiva mutación.

## 15. APÉNDICE B. Mecánica Molecular

En los análisis *in silico* desarrollados mediante química computacional se pueden describir las estructuras y las reacciones químicas a través de la aplicación de modelos matemáticos que se basan en leyes de física fundamentales. De esta forma, por ejemplo, se pueden explorar los estados de interacción y reacciones químicas en un modelo tridimensional.

La mecánica molecular es un área de la química computacional que utiliza las leyes de la física clásica para predecir estructuras y propiedades moleculares. Se trata de un conjunto de métodos computacionales ampliamente aceptados para calcular geometrías y energías moleculares.

Este método de cálculo de energías está basado en mecánica estadística, y contiene distintos términos fisicoquímicos que intervienen en el proceso de unión de un ligando a una proteína. En este método, inicialmente la proteína y el ligando se hayan solvatados por moléculas de agua. Tras la unión, las interacciones intermoleculares no enlazantes (suponiendo que no hay unión covalente), estabilizan el complejo. El cambio entrópico asociado al proceso es debido a la reducción de la libertad conformacional del ligando (supone una reducción de entropía) y por el denominado efecto hidrofóbico producido por el desordenamiento de las moléculas de agua, inicialmente ordenadas en torno al ligando y receptor, contribuyendo positivamente al cambio entrópico.

Para estos cálculos el campo de fuerza (*force field*) define los parámetros usados en la descripción de los átomos y enlaces y el tratamiento matemático que los relaciona. En primer lugar asigna a cada átomo un tipo en función de su hibridación, carga y átomos a los que está unido. A cada uno de los tipos atómicos les corresponde un grupo de parámetros: constantes de fuerza, datos atómicos (por ejemplo: radios atómicos, carga, masa) y valores estructurales de equilibrio. Estos parámetros se suelen obtener a partir de valores experimentales o bien se derivan de cálculos mecano cuánticos. Finalmente, cada campo de fuerza (*force field*) define una ecuación de energía potencial, de manera que la energía de una molécula en una conformación determinada se calcula a partir de la que tendrían idealmente las partes que la constituyen. Entonces la energía es relativa a un estado de referencia y se calcula por diferentes términos (Ecuación 2).

$$E_{total} = E_{est} + E_{bend} + E_{tors} + E_{vdw} + E_{elect} \quad [1]$$

Donde la energía potencial ( $E_{total}$ ) se determina por la adición de las energías potenciales de estiramiento ( $E_{est}$ ), de rotación de los ángulos de enlace ( $E_{bend}$ ), de torsión ( $E_{tor}$ ), de van der Waals ( $E_{vdw}$ ) y de las interacciones electrostáticas ( $E_{elect}$ ). Aunque la ecuación matemática varía entre

distintos campo de fuerza (*force field*), de manera general se incluyen dentro de los parámetros dos tipos de interacciones: A) Interacciones no enlazantes, donde actúan átomos no unidos de manera directa por enlaces como las interacciones electrostáticas y de van der Waals. B) Interacciones enlazantes, donde intervienen átomos unidos por enlaces químicos en interacciones de estiramiento de enlace, doblamiento de ángulos, ángulos diedros y ángulos impropios, además pueden incluir interacciones cruzadas que reflejan el acoplamiento entre las coordenadas internas: acoplamientos ángulo-enlace, ángulo-ángulo, enlace-enlace (Höltje, 2003). Dado que la energía del campo de fuerza (*force field*) es una medida de las restricciones estéricas intramoleculares. Por lo general, en cada modelo estudiado antes de cualquier análisis se lleva a cabo una minimización energética. Esto se lleva a cabo a través de diversos algoritmos hasta llegar a un valor mínimo lo suficientemente bajo que significaría una conformación energéticamente estable.

En los estudios de acoplamiento molecular (*docking*) realizados con dinámica molecular se hace un tratamiento riguroso de todos los grados de libertad de complejos ligando-proteína, incluyendo modelos de solvatación adecuados para calcular la energía de interacción. Para evaluar la afinidad proteína ligando, por ejemplo, se aplican las funciones de *scoring* aplicadas en cálculos como el *docking*, así como también el cálculo de la energía libre de interacción utilizando mecánica molecular (Aqvist *et al.*, 1994).

Las funciones *scoring* utilizan la aproximación de una "*master equation*" (Ajay-Murcko, 1995), la cual asume el carácter aditivo de los componentes de la energía libre (Ecuación 1).

$$\Delta G = \Delta G_{vdw} + \Delta G_{Puen\text{te de H}} + \Delta G_{elec} + \Delta G_{Conform} + \Delta G_{tor} + \Delta G_{Sol} \quad [2]$$

Donde los cuatro primeros términos corresponden a los términos típicos de mecánica molecular que consideran la interacción de van der Waals ( $\Delta G_{vdw}$ ), formación de puentes de hidrogeno ( $\Delta G_{Puen\text{te de H}}$ ), interacción electrostática ( $\Delta G_{elec}$ ) y desviaciones de la geometría covalente ( $\Delta G_{conform}$ ), adicionalmente  $\Delta G_{tor}$  modela la transición y rotación globales y la  $\Delta G_{Sol}$  incluye la desolvatación tras la unión del ligando y el efecto hidrofóbico. De esta manera obtendremos no sólo datos estructurales sino empíricos que orienten a dilucidar el mecanismo de interacción de un ligando con su receptor.

## **16. APÉNDICE C. Datos del estudio de la interacción de las subunidades $\alpha$ y $\beta$ de los canales Na<sub>v</sub>1.4**

### **16.1. Búsqueda y evaluación de las estructuras cristalográficas para predecir el sitio de interacción**

La búsqueda de plantillas estructurales que nos dieran información acerca de la interacción entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de los canales Na<sub>v</sub> fue un trabajo limitado por: (1) los tipos de canal iónico; (2) el número de subunidades presentes; (3) la similitud de las secuencias; (4) las variaciones específicas de residuos responsables de la actividad iónica; (5) la falta de información de los residuos específicos de una interfaz presente en bucles sin información estructural; y (6) los cambios de residuos debidos a la distancia filogenética.

Sin información que nos aportara un posible sitio de interacción en plantillas estructurales con similitud a los canales Na<sub>v</sub>1.4, optamos por la búsqueda a de plantillas relacionadas con el dominio globular de la subunidad  $\beta$ 1 para encontrar esta información.

El enfoque aplicado para la búsqueda implicó, no solo buscar plantillas estructurales para el modelamiento, si no también modelos con interfaces análogas que se pudieron evaluar y de las que se sacó información para establecer la interfaz de interacción entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de los canales Na<sub>v</sub>1.4 (Tabla C.1)

**Tabla C.1.** Lista de plantillas con interfaces análogas a la interacción entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de los canales Nav1.4. Los porcentajes de identidad fueron calculados comparando cada secuencia primaria contra la secuencia de la subunidad  $\beta$ 1 (NCBI Ref. Sec.: NM\_017288.1)

PDB ID	Identidad	Observaciones	Referencia
1HCF_X	19 %	Cadena X que contiene el receptor tirosina quinasa tipo 2 del factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF) en interacción con factor neurotrópico NTF-4. Este receptor posee un dominio similar a las inmunoglobulinas ( <i>Ig-like</i> ) con un plegamiento $\beta$ <i>sándwich</i> . Esta proteína pertenece a la familia <i>I-Set</i> .	Banfield <i>et al.</i> , 2001
1JPS_H	16 %	Cadena I que contiene la cadena ligera de la fracción fab d3h44; y Cadena H que contiene la cadena pesada de la fracción fab d3h44 inmunoglobulina. Los fragmentos fab abarcan un pliegue <i>Ig-like</i> . Este anticuerpo muestra una interfase con un factor tisular.	Faelber <i>et al.</i> , 2001
3GRW_A	15 %	Cadena A que contiene el receptor 3 del factor de crecimiento (FGFR3); Cadena L contiene la cadena ligera de la fracción fab; y Cadena H cadena pesada de la fracción fab. La interfase análoga entre el plegamiento del dominio <i>Ig-like</i> del anticuerpo y le FGFR3 es comparable con la presente en 1JPS	Qing <i>et al.</i> , 2009
3KLD_A	18 %	Cadena A contiene los fragmentos <i>Ig-like</i> 1-4 de la contactina 4 Cadena B contiene el fragmento del dominio similar a la anhidrasa carbónica de la proteína tirosina y fosfatasa. Las proteínas enlazadas forman una interfase análoga.	Bouyain <i>et al.</i> , 2010
1NEU_A	27 %	Cadena A dominio extracelular de la proteína de mielina PO de los nervios periféricos con un dominio <i>Ig-like</i> típico; cinco de los residuos de la región C-terminal muestran una clara flexibilidad sugiriendo un anclaje a la membrana. Carece de información de interacción.	Shapiro <i>et al.</i> , 1996
3FXI_C	11 %	Cadena A, B contienen el receptor similar a los receptores toll tipo 4 en complejo con el factor de diferenciación mieloides 2 (MD-2) (Cadena C, D) y lipopolisacáridos bacterianos (LPS). Los receptores tipo toll muestran una repeticiones de leucina flanqueadas por dominios ricos en cisteína comunes a moléculas con características de unión proteína a proteína.	Park <i>et al.</i> , 2009

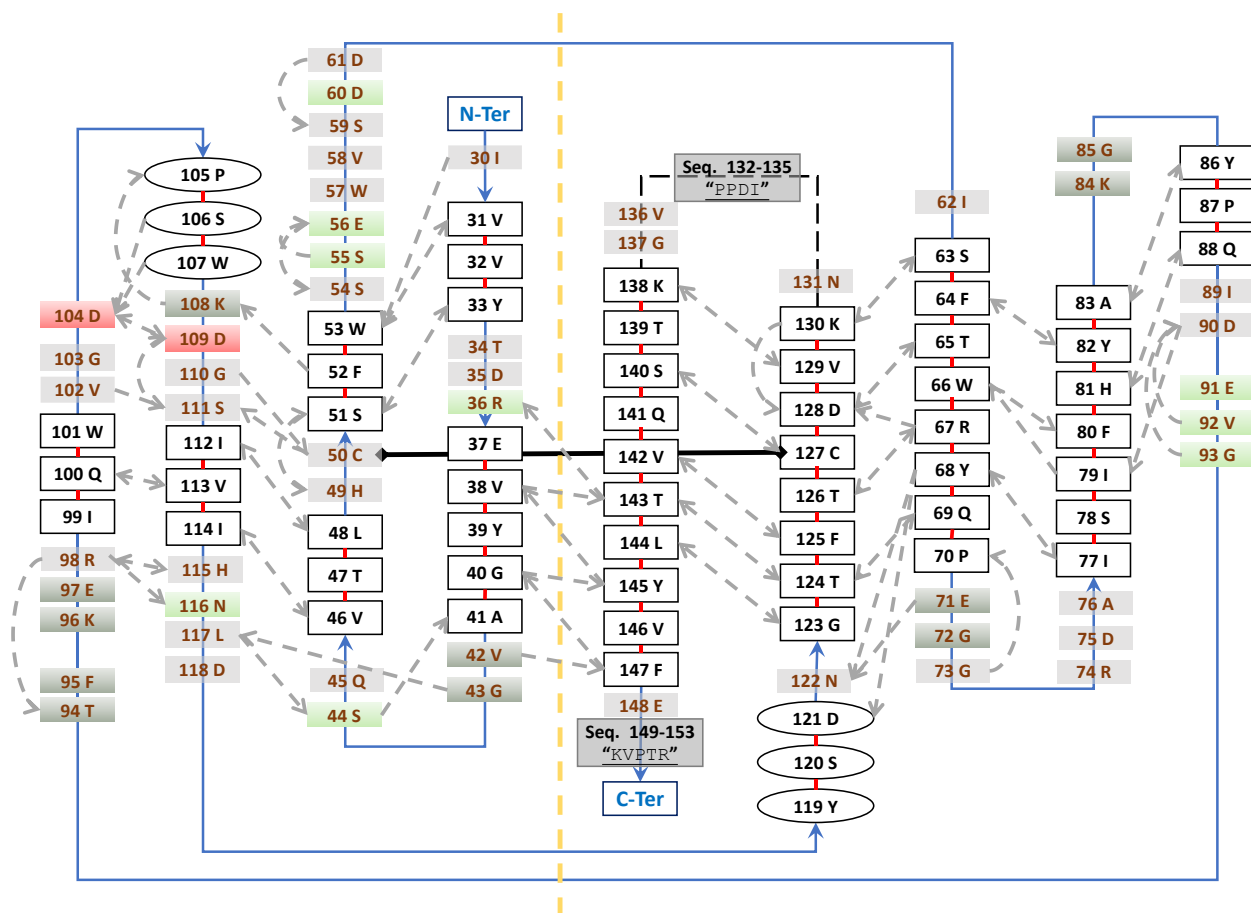
## 16.2. Estudios topológicos para evaluar las características estructurales entre las plantillas tridimensionales

La alineación de las plantillas tridimensionales seleccionadas con la secuencia de la subunidad  $\beta 1$  mostró una homología por debajo de 30 % y una cobertura entre 100 a 150 residuos. Este nivel de homología cae en la zona denominada “*crepúsculo*”, este nivel no es recomendado para el modelamiento por homología dado que resultaría en un alineamiento aleatorio que puede ocultar residuos importantes para la actividad biológica (Bourne, Weissig et al., 2003). Por tal motivo un modelamiento por homología desatendido fue despreciado y se prefirió un enfoque mixto.

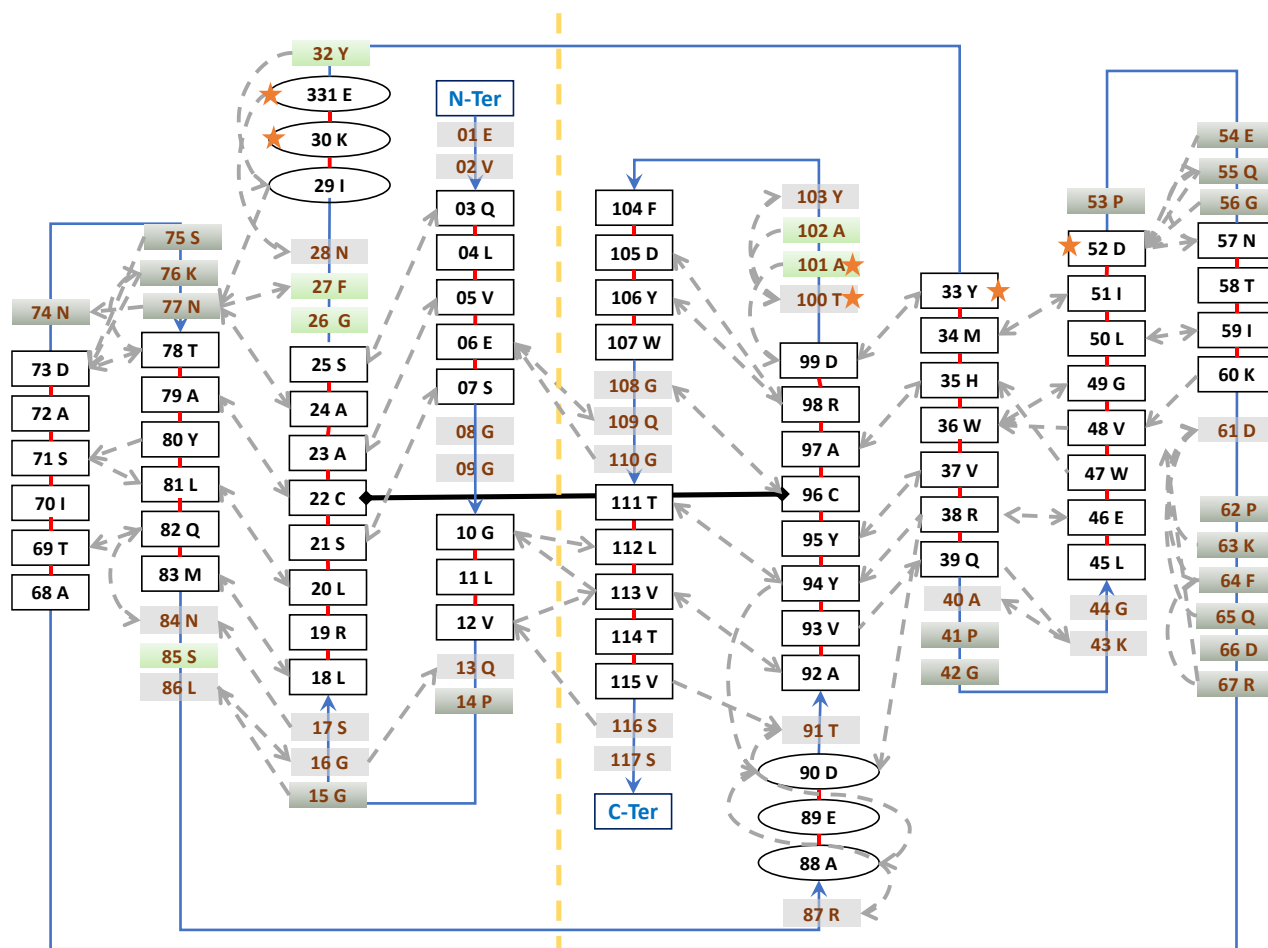
En lugar de tratar de buscar el modelo cristalográfico con mejor homología de la interacción  $\alpha$  y  $\beta$ , el enfoque fue buscar relaciones estructurales con plantillas de manera análoga. Se prefirió la búsqueda de la interfaz sobre el dominio globular de la subunidad  $\beta 1$ , ya que tenía un menor tamaño y complejidad que el canal Na<sub>v</sub> completo.

Para encontrar las relaciones estructurales se construyeron modelos topológicos bidimensionales de las proteínas que pertenecían al grupo con dominios similares a las inmunoglobulinas *Ig-like* y que tenían un plegamiento de tipo  $\beta$  *sandwich* (Figuras C.1-C.5). Con estos diagramas se alinearon de forma manual la secuencia de la subunidad  $\beta 1$  correspondiendo la información estructural conocida de las plantillas y la estructura secundaria predicha para la subunidad  $\beta 1$ . Además se tomaron en cuenta sitios de interfaz, puentes salinos, puentes disulfuro, hélices 3/10, giros beta que fueron incorporados un modelo topológico que sirvió de base para la predicción de un sitio de interacción (Figura C.6).

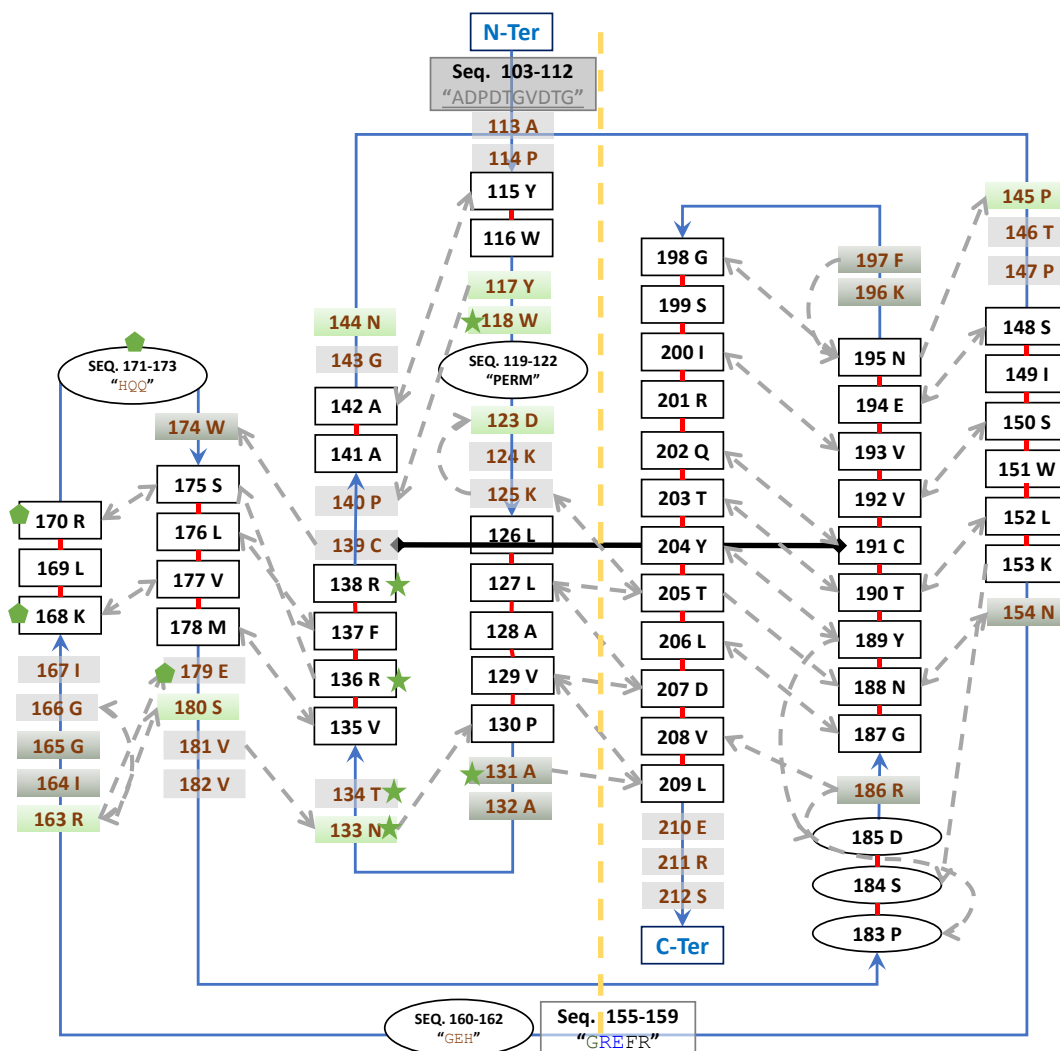
En este modelo la interacción de la subunidad  $\beta 1$  se daría en una zona donde los aminoácidos F59, I108, N109, N114, S116, H122 y V123 forman parte de una interfaz similar al dominio CDR3 presente en proteínas inmunoglobulinas. Es este dominio en el que se sustituyeron los residuos de treonina 109 (T109) y asparagina 110 (N110) a alanina dado que se determinó que estos residuos modificarían la interfaz evitando la interacción entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de los canales Na<sub>v</sub>1.4.



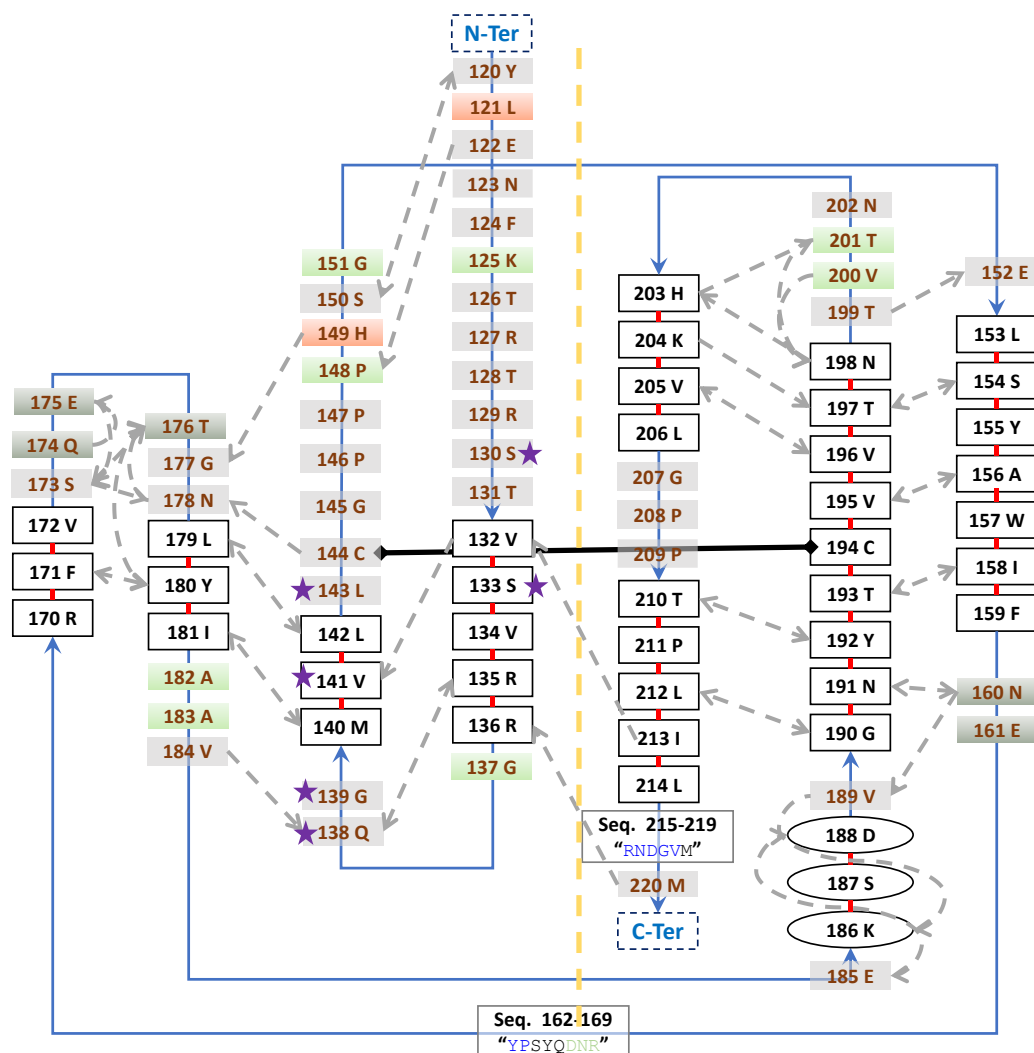
**Figure C.1. Diagrama topológico de la proteína mielina P0 (PDB ID: 1NEU\_A).** Se pueden observar la secuencia y la topología de la estructura cristalográfica de la proteína mielina P0 de rata (Shapiro et al., 1996). Código: □ residuos con conformación beta plegadas; ▒ secuencias interloops; ▒ secuencias que forman giros; ○ helices 3/10; - - - puentes de hidrogeno; - - - division de las dos caras de conformacion de sandwich; puentes de hidrogeno → direccion de la secuencia; ◆◆ puente disulfuro.



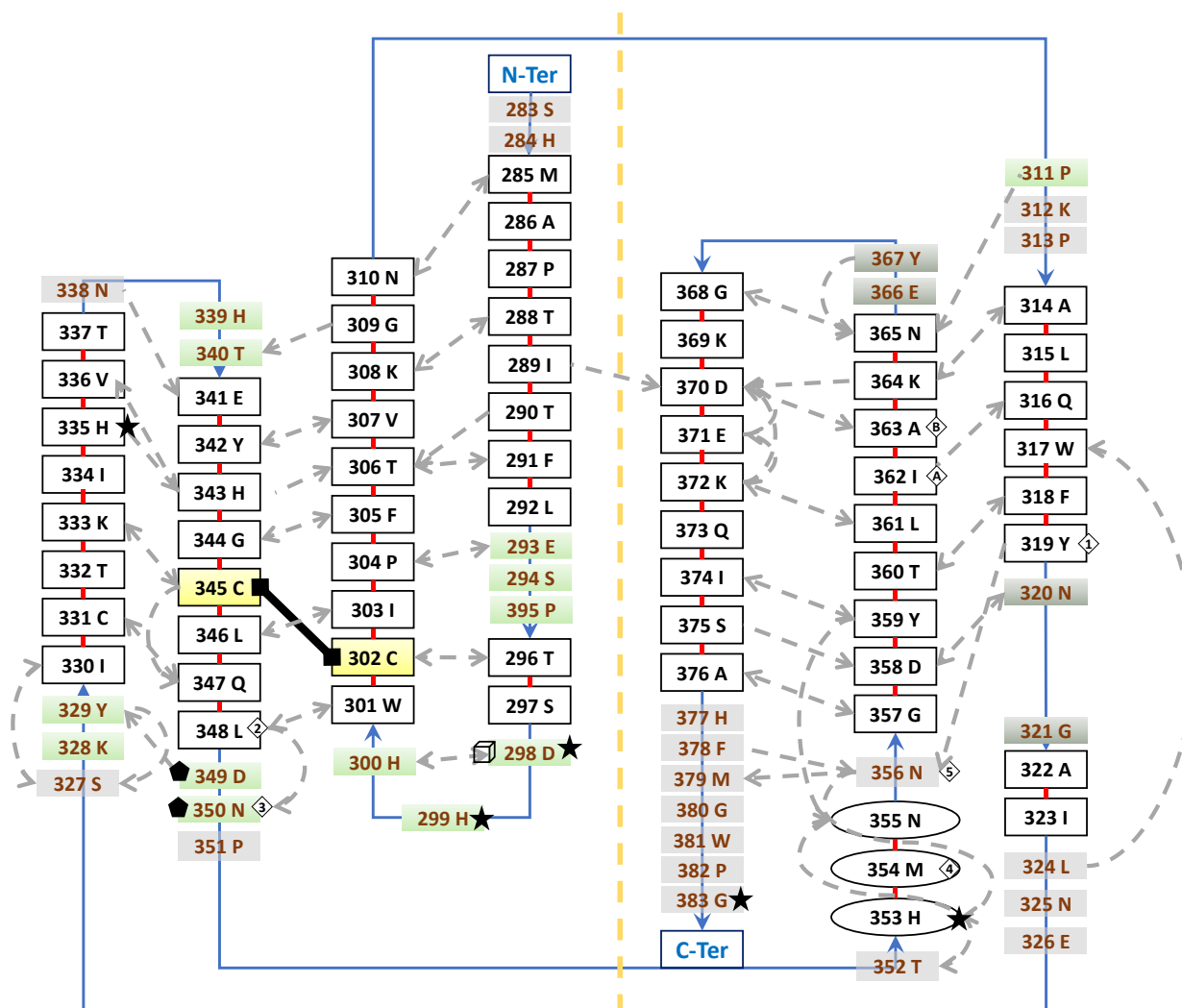
**Figure C.2. Diagrama topológico la fracción fab d3h44 humanizada (PDB ID: 1JPS\_H).** Se pueden observar la secuencia y la topología de la estructura cristalográfica de la fracción fab d3h44 humanizada de humano (Faelber et al., 2001). Código: □ residuos con conformación beta plegadas; ▒ secuencias interloops; ▒ secuencias que forman giros; - - - puentes de hidrogeno; - - - division de las dos caras de conformacion de sandwich; → direccion de la secuencia; ↔ puente disulfuro; ★ sitios de interacción entre la cadena H y la cadena T del modelo.



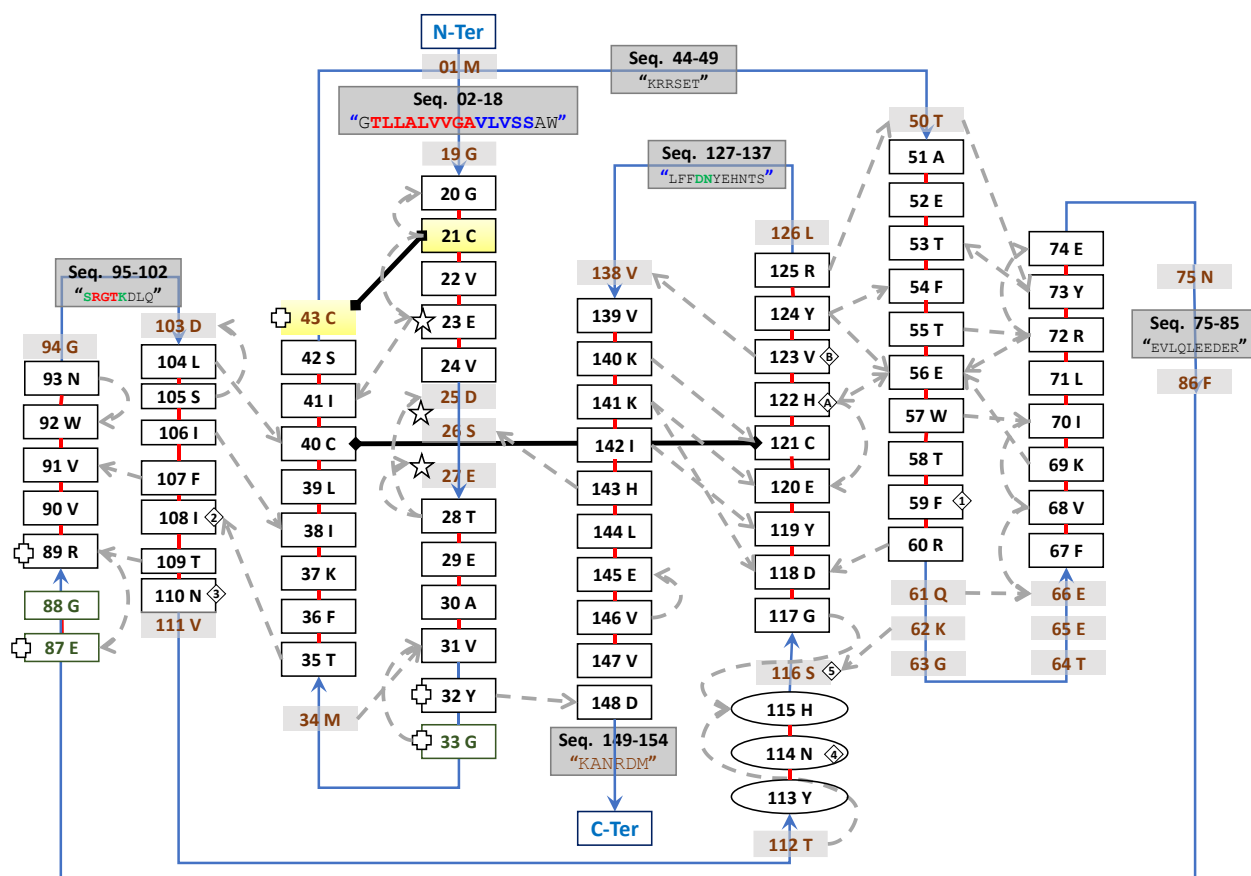
**Figure C.3. Diagrama topológico del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (PDB ID: 3GRW\_A).** Se pueden observar la secuencia y la topología de la estructura cristalográfica del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos de humano (Qing et al., 2009). Código: □ residuos con conformacion beta plegadas; ▒ secuencias interloops; ; ▒ secuencias que forman giros; - - - puentes de hidrogeno; - - - division de las dos caras de conformacion de sandwich; → direccion de la secuencia; ↔ puente disulfuro; ★ sitios de interacción entre la cadena A y la cadena H del modelo. ◆ sitios de interacción entre la cadena A y la cadena L del modelo.



**Figure C.4. Diagrama topológico de la contactina 4 (PDB ID: 3KDL\_A).** Se pueden observar la secuencia y la topología de la estructura cristalográfica de la contactina 4 de ratón (Bouyain y Watkins, 2010). Código: □ residuos con conformación beta plegadas; ▒ secuencias interloops; ■ secuencias que forman giros; - - - puentes de hidrogeno; - - - división de las dos caras de conformación de sandwich; → dirección de la secuencia; ◆◆ puente disulfuro; ☆ sitios de interacción entre la cadena A y la cadena B del modelo.



**Figure C.5. Diagrama topológico del receptor factor de crecimiento BDNF/NT-3 (PDB ID: 1HCF\_X).** Se pueden observar la secuencia y la topología del receptor al factor de crecimiento BDNF de humano (Ultsch et al., 1999). Código:  residuos con conformacion beta plegadas;  secuencias interloops;  secuencias que forman giros;  puentes de hidrogeno;  division de las dos caras de conformacion de sandwich; → direccion de la secuencia;  puente disulfuro;  puentes de sal; ★ sitios de interacción entre la cadena A y la cadena X del modelo; ◆ sitios de interacción entre la cadena A y la cadena X del modelo.  nucleo de residuos que participarían en la interacción entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de los canales Na<sub>v</sub>1.4.



**Figure C.6. Diagrama topológico final de la subunidad  $\beta 1$  después de alinear manualmente la secuencia a través de la estructura tridimensional de los moldes.** Se pueden observar las posiciones finales de los residuos en la subunidad  $\beta 1$  respetando (conservando lo más posible) la información de la estructura secundaria. Código:  residuos con conformación beta plegadas;  secuencias interloops; - - - puentes de hidrogeno; - - - division de las dos caras de conformación de sandwich; → dirección de la secuencia; ◆ puente disulfuro; + mutaciones realizadas por Islas *et al.* 2013; ★ mutaciones relaizadas por McCormick *et al.* 1998; ◇ nucleo de residuos que participarían en la interacción entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de los canales Na<sub>v</sub>1.4.