



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**Facultad de Medicina**

Licenciatura en Biomedicina

**Instituto de Fisiología**

Laboratorio de Biofísica cardiaca

**ESTUDIO DE LOS EFECTOS ELECTROFISIOLÓGICOS DE  
CANNABINOIDEOS EN EL CANAL DE SODIO VOLTAJE DEPENDIENTE NAV**

**1.4**

Tesis que para obtener el grado de:

**Lic. en Biomedicina**

Presenta:

Amairani Domínguez Bahena

Director de tesis:

Dr. Eduardo M. Salinas Stefanón

Noviembre 2021

## ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	2
RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
JUSTIFICACIÓN .....	6
DESARROLLO .....	7
1.MEMBRANA CELULAR.....	7
2.CANALES IÓNICOS.....	8
2.1CANALES DE SODIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE .....	9
2.2CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS.....	15
3.CANNABINOIDES .....	17
3.1.EFECTO DE LOS CANNABINOIDES EN CORRIENTES DE SODIO .....	20
3.1.1.EFECTOS DE CANNABINOIDES DESCRITOS EN EL CANAL NAV 1.4.....	26
4.¿POR QUÉ ES IMPORTANTE ELCANAL DE SODIO NAV 1.4?.....	33
4.1.1MECANISMO DE ACOUPLE EXITACIÓN-CONTRACCIÓN.....	34
4.2CANALOPATÍAS RELACIONADAS CON EL CANAL NAV 1.4.....	35
CONCLUSIONES.....	39
PERSPECTIVAS .....	40
BIBLIOGRAFÍA.....	41
ANEXOS.....	46

## ABREVIATURAS

2-AG. 2-araquidonil glicerol.

AEA. N-araquidonil etanolamida. / Anandamida

AJA. Ácido ajulémico.

AL. Anestésico local.

AL. Anestésicos locales.

BTX. Batracotoxina.

CAMs. Moléculas de adhesión celular.

CAMs. Superfamilia de inmunoglobulinas.

CB1. Receptor cannabinoide tipo 1.

CB2. Receptor cannabinoide tipo 2.

CBD. Cannabidiol.

CHO. Célula epitelial ovárica de hámster chino.

CTXs. Ciguatoxinas.

DHPR. Receptores de rianodina.

ECS. Sistema endocannabinoide.

Em. Potencial de membrana.

GFA. Ensamblaje de fragmentos gráficos.

GOF. Ganancia de función.

HEK293T. Células 293T de riñón embrionario humano.

HiperPP. Parálisis periódica hiperpotasémica.

HipoPP. Parálisis periódica hipopotasémica.

IFMT. Isoleucina, Fenilalanina, Metionina, Tirosina.

MD. Docking molecular.

Na. Sodio.

Nav 1.4: Canal de sodio dependiente de voltaje, isoforma 1.4.

Navs. Canales de sodio activados por voltaje.

NMR. Resonancia magnética nuclear.

PAM. Miotonía agravada por potasio.

PbTx. Brevetoxinas.

RyR. Receptores de rianodina.

SF. Filtro de selectividad.

SMC. Miotonías de los canales de sodio.

STX. Saxitoxina.

THC.  $\Delta$ -9-tetrahidrocannabinol.

TTX. Tetrodotoxina.

VGSC. Canales de sodio dependientes de voltaje.

VSD. Dominio sensible al voltaje.

WT. Wild type.

## RESUMEN

Los canales de sodio dependientes de voltaje son los principales responsables de la despolarización de células del tejido eléctricamente excitable, componente esencial para la generación y propagación del potencial de acción. Han sido investigados haciendo uso de la electrofisiología, la biofísica y otras herramientas como estudios farmacológicos y mutaciones dirigidas al sitio.

Los cannabinoides han demostrado regular y ejercer efectos sobre múltiples funciones fisiológicas, por lo cual han despertado gran interés por identificar nuevas terapias farmacológicas. Ejercen efectos sobre blancos específicos tales como sus receptores CB1 y CB2, además de ser reguladores de dianas diferentes a estos, tales como los canales de sodio dependientes de voltaje; sin embargo, sus mecanismos de acción aún no están completamente dilucidados.

El presente trabajo indaga en las interacciones y efectos electrofisiológicos de cannabinoides sobre canales de sodio dependientes de voltaje, los cuales han mostrado reducir las corrientes de sodio. En este caso se busca evaluar los efectos sobre la isoforma Nav 1.4, un canal que está involucrado en la transmisión de señales en el músculo esquelético, que conlleva al fenómeno de contracción muscular, pero que poco se ha estudiado comparado con otras isoformas de los canales de sodio.

## INTRODUCCIÓN

Cada vez aparecen más publicaciones científicas que describen efectos positivos de cannabinoides como fármacos dirigidos a proteínas diana como lo son los canales de sodio dependientes de voltaje; los cannabinoides han mostrado modular algunos síntomas de ciertas enfermedades en las que se ven involucradas dichas proteínas (Devinsky et al., 2017; Russo, 2016). Nos encontramos ante un tema de evidente actualidad en el que se hace necesario conocer con exactitud las propiedades medicinales de estos compuestos.

Los canales de sodio han demostrado ser dianas valiosas para el tratamiento terapéutico del dolor crónico, la epilepsia y las arritmias cardíacas, entre otras afecciones (O'Leary, 2017). Dependiendo de la isoforma del canal, tendrá características funcionales similares y algunas diferencias en sus propiedades electrofisiológicas y moleculares, así como difieren también en porcentaje de expresión en el organismo. El canal  $Na_v$  1.4 es la isoforma más abundante en el músculo esquelético, y se ha observado su expresión a niveles más bajos en el músculo esquelético neonatal (Catterall, 2014). Su función fisiológica principal es controlar la excitabilidad de las fibras musculares al iniciar el potencial de acción, lo que posteriormente causará la contracción muscular.

Los cannabinoides inhiben o modulan a los canales de sodio dependientes de voltaje (Watkins, 2019). Cannabinoides probados en canales  $Na_v$  1.4 producen una inhibición marcada en la corriente de sodio, así como una afinidad por el estado inactivo del canal (Foadi et al., 2014; Ghovanloo et al., 2018; Ghovanloo et al., 2021). Esta inhibición podría contribuir a la reducción de las contracciones del músculo esquelético, un valor terapéutico potencial contra canalopatías propias de estos canales (Ghovanloo et al., 2021). Estudios *in silico*, *in vitro* e incluso en *ex vivo* muestran evidencias de este efecto sobre la corriente y la contracción muscular. Sin duda alguna, la investigación que se lleve a cabo en esta área durante los próximos años traerá consigo la respuesta a estas cuestiones, y quizá nuevos fármacos que puedan ser empleados en el tratamiento de desórdenes que en la actualidad carecen de buenas opciones terapéuticas.

## JUSTIFICACIÓN

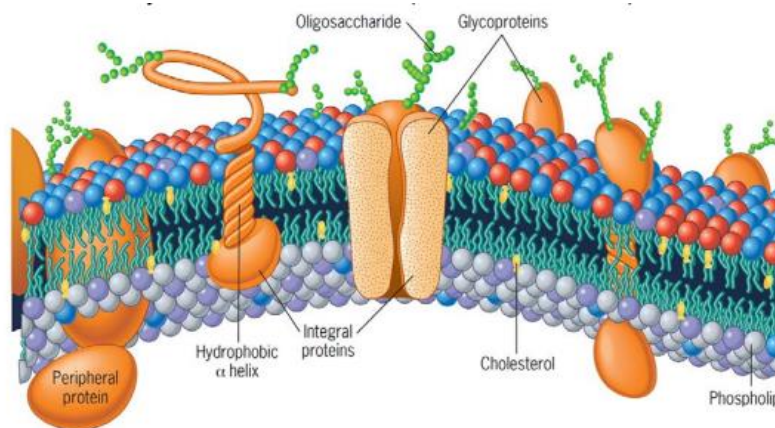
Mientras que inicialmente se pensaba que los cannabinoides interactuaban con sus receptores CB1 o CB2 específicos, un creciente cuerpo de investigación demuestra que estos compuestos químicos pueden interactuar con una amplia gama de otros objetivos, como los canales de sodio. Actualmente se cuenta con resultados que demuestran el efecto inhibitorio sobre diferentes isoformas presentes en el organismo, en su mayoría neuronales (Nicholson et al., 2003; Okura et al., 2018; Ghovanloo et al., 2018; Sait et al., 2020). Sin embargo, es poca la evidencia en el sistema nervioso periférico, y por tal motivo resulta importante describir si los compuestos cannabinoides modulan a la isoforma  $Na_v$  1.4 de la misma manera en que lo hacen en otras isoformas.

Los canales  $Na_v$  1.4 son componentes esenciales para algunos fenómenos de importancia fisiológica, como la contracción muscular, la sensación de dolor, etc, por eso su importancia como posible blanco farmacológico. Al día de hoy las aplicaciones terapéuticas no son muy concretas en canalopatías que involucran a  $Na_v$  1.4, aunque es de esperar que las nuevas estrategias que se están explorando en la actualidad permitan desarrollar nuevos candidatos a fármacos con perfiles de seguridad y eficacia optimizados, permitiendo así abordar el tratamiento de desórdenes que en la actualidad carecen de buenas opciones terapéuticas.

## DESARROLLO

### 1. MEMBRANA CELULAR

Para toda célula que conforma un tejido, es vital mantener una concentración diversa de sustancias en su interior y en el exterior. Esto origina una desigualdad de cargas eléctricas a ambos lados de la membrana celular, permitiendo a esta un desequilibrio dinámico que oscila alrededor de un estado estable (potencial de reposo) el cual, mediante un mecanismo molecular, es capaz de reaccionar apropiadamente a una serie de variaciones para regresar a tal estado estable. Las variaciones de este potencial eléctrico ocurren por medio del intercambio de partículas inorgánicas con carga que provocan un comportamiento dinámico y regenerativo conocido como potencial de acción. De esta forma la célula puede detectar las señales del ambiente, recibir y transmitir información codificada. Esta característica de la cual depende su supervivencia es posible gracias al control preciso del contenido de la célula, para ello la célula posee una estructura especializada llamada membrana celular (Figura 1).



**Figura 1.** El modelo de mosaico fluido para la estructura de la membrana celular (Tomada de Karp, 2014).

En todas las células, la membrana contiene en su estructura diferentes proteínas. Estas se clasifican de acuerdo a su localización dentro de la bicapa lipídica o en la superficie de ésta, las dos clases principales de proteínas de membranas son: las proteínas integrales y las proteínas periféricas. Entre sus

funciones permiten llevar a cabo acciones como transporte de moléculas o iones, que son impermeables, así como también actúan como sensores de señales externas, lo que permite que la célula cambie su comportamiento en respuesta a señales ambientales, incluidas las señales de otras células (Alberts, 2015).

Las responsables de originar y mantener las variaciones del potencial de membrana, son ciertas proteínas presentes en la membrana celular que forman vías conductoras de iones llamadas canales iónicos (Hille, 2001). Estas generan diferencias de concentraciones iónicas a ambos lados de la bicapa lipídica, con lo que la membrana celular puede almacenar energía potencial en forma de gradientes electroquímicos, convirtiendo así estas señales electroquímicas en información vital para la célula (Alberts, 2015).

## 2. CANALES IÓNICOS

Hodgkin y Huxley desarrollaron en 1952 el primer modelo para explicar la excitabilidad basada en dos propiedades elementales, la permeabilidad iónica (flujo de iones a través de los canales de la membrana) y el mecanismo de compuerta o *gating* (cambios conformacionales dinámicos en respuesta a fluctuaciones iónicas de la membrana). El desarrollo en 1940 de la técnica de registro de corrientes a través de la membrana de células excitables por fijación de voltaje descrita por Cole, permitió a Hodgkin y Huxley sentar las bases iónicas del potencial de acción. Actualmente, esta técnica permite profundizar en el estudio de las propiedades de estos canales: conducción, dependencia de voltaje, rectificación, selectividad iónica, activación, inactivación, y la farmacología de los compuestos químicos que, se sabe, tienen efectos directos sobre el canal, modificando sus características electrofisiológicas (Catterall, 2000; Hille, 2001).

Los canales iónicos son poros acuosos constituidos por componentes funcionales, a saber, un filtro de selectividad, un sensor de voltaje, un vestíbulo externo, un vestíbulo interno y, en algunos casos una compuerta de inactivación. Operan mediante compuertas, y sus funciones dependen no solo de su

especificidad iónica y velocidad, si no de su capacidad para abrir y cerrar en forma selectiva en periodos cortos de tiempo. La apertura y cierre de los canales iónicos es un proceso denominado operación o regulación por compuertas o *gating*, y puede producirse en respuesta a diversos estímulos (Voet, 2007). Dependiendo del tipo de mecanismo de compuerta los canales se pueden distinguir en canales activados por voltaje, activados por ligando y activados por tensión o volumen (Martinez, 2004).

La mayor parte son muy selectivos, sobre todo los dependientes de voltaje, ya que solo permiten el paso de un tipo de ion a través del poro. La actividad de estas proteínas es dependiente de voltaje y tiempo (De Lera, & Kraus, 2015). Este movimiento de iones a través de los canales iónicos genera corrientes eléctricas que, como consecuencia, producen cambios en el potencial de membrana (Em) (Hille 2001).

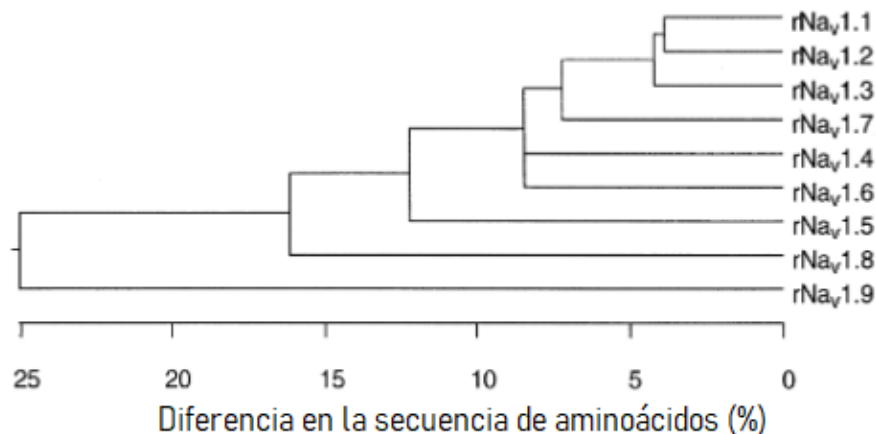
Además de los estados abierto y cerrado que pueden presentar los canales iónicos, la mayoría pasa por un estado intermedio denominado estado inactivado, el cual sucede cuando un estímulo que abre el canal se ha prolongado por más tiempo provocando que los canales se desensibilicen al estímulo, por lo que ya no permiten el paso de iones; cuando el estímulo ha terminado regresan nuevamente al estado cerrado, es decir, vuelven a estar disponibles para abrirse ante un nuevo estímulo (Alberts, 2015).

## 2.1 CANALES DE SODIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE

Los canales de sodio dependientes de voltaje ( $Na_v$ ) son un grupo de proteínas que permiten el paso de iones sodio a través de la membrana; la actividad de estos canales es modulada por los cambios en el potencial de la membrana celular. Se expresan en prácticamente todos los tejidos eléctricamente excitables y son esenciales para la contracción muscular y la conducción de impulsos dentro de los sistemas nerviosos central y periférico (Catterall, 2000).

Dependiendo de la isoforma del canal, tienen características funcionales similares y algunas diferencias en sus propiedades electrofisiológicas y

moleculares, así como difieren también en su porcentaje de expresión en el organismo. Los  $Na_v$  comprenden una familia de nueve subfamilias de canales. La familia está compuesta por nueve genes que derivan en nueve proteínas distintas ( $Na_v1.1$ - $Na_v1.9$ ) y una nueva subfamilia llamada  $Na_vX$  (Catterall, 2012). Las isoformas del canal de sodio voltaje dependiente de mamífero que se han identificado poseen una homología o porcentaje de identidad de su secuencia de aminoácidos mayor al 50 % (Figura 2) (Catterall, 2015).



**Figura 2.** Diferencia en la secuencia de aminoácidos de las subunidades alfa de los canales de sodio dependientes de voltaje de rata (Goldin et al., 2000).

Estos canales tienen motivos estructurales comunes, pero difieren en sus secuencias de aminoácidos y en su sensibilidad a las neurotoxinas. Se han logrado determinar las regiones de la proteína que hacen contacto con los iones, utilizando técnicas de mutación puntual y estudiando los efectos producidos por el bloqueo con toxinas como: tetrodotoxina (TTX) y saxitoxina (STX) (Schlief, Schonherr et al., 1996).

Como se mencionó anteriormente, podemos distinguir entre 9 isoformas de la familia de los  $Na_v$ s, del 1.1 al 1.9.  $Na_v$  1.1,  $Na_v$  1.2,  $Na_v$  1.3 y  $Na_v$  1.6 se expresan en el sistema nervioso central; en cambio,  $Na_v$  1.4 y  $Na_v$  1.5 trabajan en el músculo esquelético y el corazón, respectivamente.  $Na_v$  1.7,  $Na_v$  1.8 y  $Na_v$  1.9 se encuentran principalmente en el sistema nervioso periférico. Cada isoforma está codificada por un gen distinto que va del gen SCN1A al SCN11A, y se clasifican por su homología

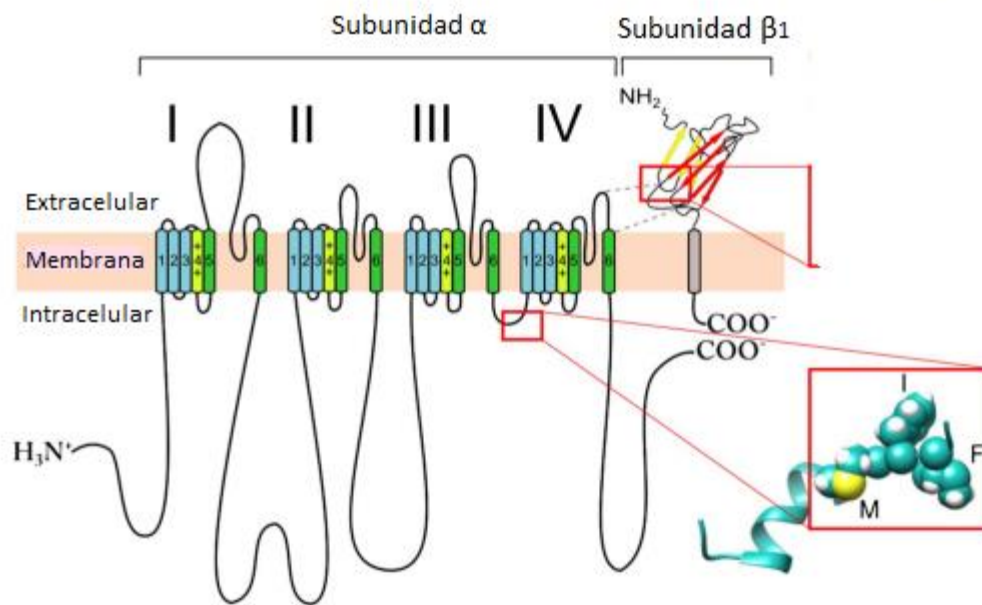
y por su sensibilidad a TTX. Las subunidades Nav1.1 a Nav1.4, junto con Nav1.6 y Nav1.7 son consideradas sensibles a la TTX, mientras que las subunidades Nav1.5, Nav1.8 y Nav1.9 son resistentes a la TTX (Tabla 1) (Catterall, 2005).

Subunidad $\alpha$	Gen	Expresión	TTX EC <sub>50</sub>
Nav 1.1	SCN1A	Sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso central periférico (SNP), células de la raíz del ganglio dorsal (DRG) y túbulos T en miocitos.	6 nM
Nav 1.2	SCN2A	SNC, axones amielínicos y premielínicos.	12 nM
Nav 1.3	SCN3A	SNC, embrional y miocitos cardiacos.	4 nM
Nav 1.4	SCN4A	Músculo esquelético.	5 nM
Nav 1.5	SCN5A	Miocitos cardiacos, músculo inmaduro o denervado y algunas neuronas del SNC.	26 nM Resistente
Nav 1.6	SCN8A	SNC (hipocampo, células Purkinje, astrocitos), SNP, células DRG y Schwann, túbulos T en miocitos.	1 nM
Nav 1.7	SCN9A	Todo tipo de neuronas DRG y simpáticas, células de Schwann y neuroendocrinas.	4 nM
Nav 1.8	SCN10A	Células DRG, corazón humano y neuronas intracardiacas.	60 nM Resistente
Nav 1.9	SCN11A	Neuronas tipo C en células DRG (Nocicepción).	40 nM Resistente

**Tabla 1.** Familia de canales de sodio dependientes de voltaje, genes relacionados, localización en el organismo y su resistencia a TTX (EC<sub>50</sub>) (Goldin, 2000).

El aislamiento de fragmentos de cDNA del canal de sodio de anguila eléctrica realizados por Noda y colaboradores en 1984, produjo el primer acercamiento al conocimiento de la estructura primaria del canal. Más tarde Guy y Seetharamulu, en 1986, haciendo uso de modelado molecular, generaron con gran precisión el modelo de plegamiento de la subunidad  $\alpha$  de aproximadamente 2,000 aminoácidos organizada en 4 dominios homólogos (DI-DIV), compuesto cada uno por 6 segmentos  $\alpha$ -hélices transmembrana (S1-S6). Hay mucha evidencia que confirma que S4 constituye el dominio sensible al voltaje (VSD), mientras que S5 y S6

constituyen el dominio del poro, y las secuencias entre S5 y S6 forman los dominios extracelulares y el filtro de selectividad (SF). El poro se divide en dos partes: la boca exterior, lugar del filtro de selectividad iónica, mientras que la parte del poro citoplasmático interior sirve como la puerta de activación del canal. Investigaciones han indicado que, a diferencia de otros canales, los de sodio poseen una alta asimetría en su filtro de selectividad que está conformado por cuatro aminoácidos distintos, Asp/ Glu/Lys/Ala (DEKA), que confieren selectividad al ion sodio (Pan, 2018). La determinación del filtro se ha podido realizar gracias al empleo de las toxinas guanidínicas, tetrodotoxina (TTX) y saxitoxina (STX); estas moléculas bloquean el anillo DEKA uniéndose a la boca externa del canal con alta especificidad (Hille, 2001). Se logró identificar después un sitio conservado que está formado por isoleucina-fenilalanina-metionina-treonina (IFMT), ubicado en el enlazador DIII-DIV que mantendrá cerrada la compuerta de inactivación hasta que el potencial de membrana vuelve a un voltaje hiperpolarizado.



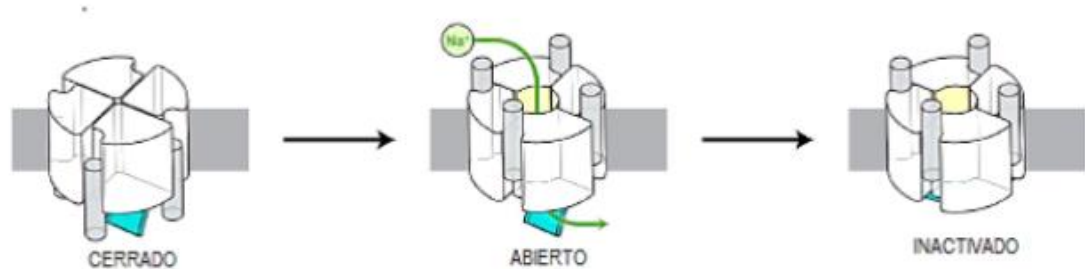
**Figura 3.** Composición del canal de sodio dependiente de voltaje. Topología de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta_1$  del canal de sodio. Muestra la estructura 3D del motivo IFM; las partículas de inactivación se muestran en azul en el recuadro (Sánchez-Solano et al., 2016).

Las subunidades centrales  $\alpha$ , de 260 kDa, son suficientes para la permeabilidad de los iones; sin embargo, funciones como el tráfico de membrana y las propiedades de los canales son moduladas por una o dos subunidades  $\beta$ . Las subunidades  $\beta 1/3$  y  $\beta 2/4$  son proteínas transmembrana que tienen un dominio de inmunoglobulina extracelular que se une a la subunidad  $\alpha$  del canal (Lai and Jan 2006). Se ha encontrado que las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 3$  se asocian de manera no covalente a la subunidad  $\alpha$ , mientras que las subunidades  $\beta 2$  y  $\beta 4$  se encuentran unidas covalentemente a la subunidad  $\alpha$  mediante un puente disulfuro (Brackenbury, 2008).

La transmisión de información se produce por medio del disparo repetitivo de potenciales de acción en circuitos neuronales, y el control de la excitabilidad en células musculares y nerviosas, requieren de una inactivación y recuperación rápida de los canales de sodio, por lo que estos se abren en respuesta a depolarizaciones e inactivan en un rango de 1 a 2 ms (Catterall, 2012). Se ha explorado el funcionamiento y la cinética de los canales de sodio dependientes de voltaje con diversas técnicas de estudio que nos han mostrado su función y parte de su estructura. Los registros electrofisiológicos han sido de gran ayuda para el entendimiento de las propiedades de los canales.

La activación de los canales sodio depende de que el potencial de membrana sea detectado por el sensor de voltaje, que determinará el estado del canal. Se ha observado que a potenciales de reposo hiperpolarizantes la probabilidad de que se encuentren abiertos es baja. Cuando la membrana se despolariza ocurre un cambio conformacional de la subunidad  $\alpha$  inducido por el movimiento dentro del dominio del sensor de voltaje, cambio que resulta en la apertura del poro del canal. Los canales  $Na_v$  se abren de manera rápida provocando la entrada de  $Na^+$ ; al cabo de unos milisegundos, ocurre una transición de los canales abiertos a un estado inactivado no conductor. Un modelo comúnmente aceptado de la inactivación del canal de  $Na^+$ , propone que el asa intracelular que conecta el dominio III y el IV, constituye la compuerta de inactivación, que se dobla hacia el extremo de salida y bloquea el poro desde dentro durante despolarizaciones sostenidas gracias a un par de

residuos de glicina que actúan a manera de bisagra (Catterall, 2001). La inactivación rápida de los canales  $\text{Na}_v$  se refiere al rápido decaimiento de las corrientes de sodio ( $\text{I}_{\text{Na}}$ ) observado en respuesta a despolarizaciones cortas y ocurre gracias al cierre de la compuerta intracelular de inactivación. En contraste, la inactivación lenta de los canales se puede desarrollar cuando las fibras musculares o nerviosas son excitadas por periodos largos, y es causada por cambios a largo plazo en el potencial de reposo de la membrana o durante periodos largos de disparos repetitivos (figura 4) (Catterall, 2014). Un diagrama simplificado del ciclo del trabajo de los canales de sodio incluye transiciones entre estados de reposo, activación e inactividad (Pan, 2018).



**Figura 4.** Representación esquemática de los diferentes estados de los canales de sodio dependientes de voltaje  $\text{Na}_v$  de mamíferos basada en el modelo de inactivación acoplada (Modificado de Ahern et al., 2015).

Teniendo en cuenta las diversas funciones de los segmentos S6, no es sorprendente que la unión de algunos fármacos dentro del poro de estos canales inhiba la corriente de  $\text{Na}^+$  y modifique la compuerta del canal. (O'Leary, 2017). Por su gran importancia fisiológica, los canales de sodio se han investigado ampliamente y se han podido sugerir mecanismos por los cuales estos interactúan con ciertos fármacos, mostrando efectos regulatorios particulares.

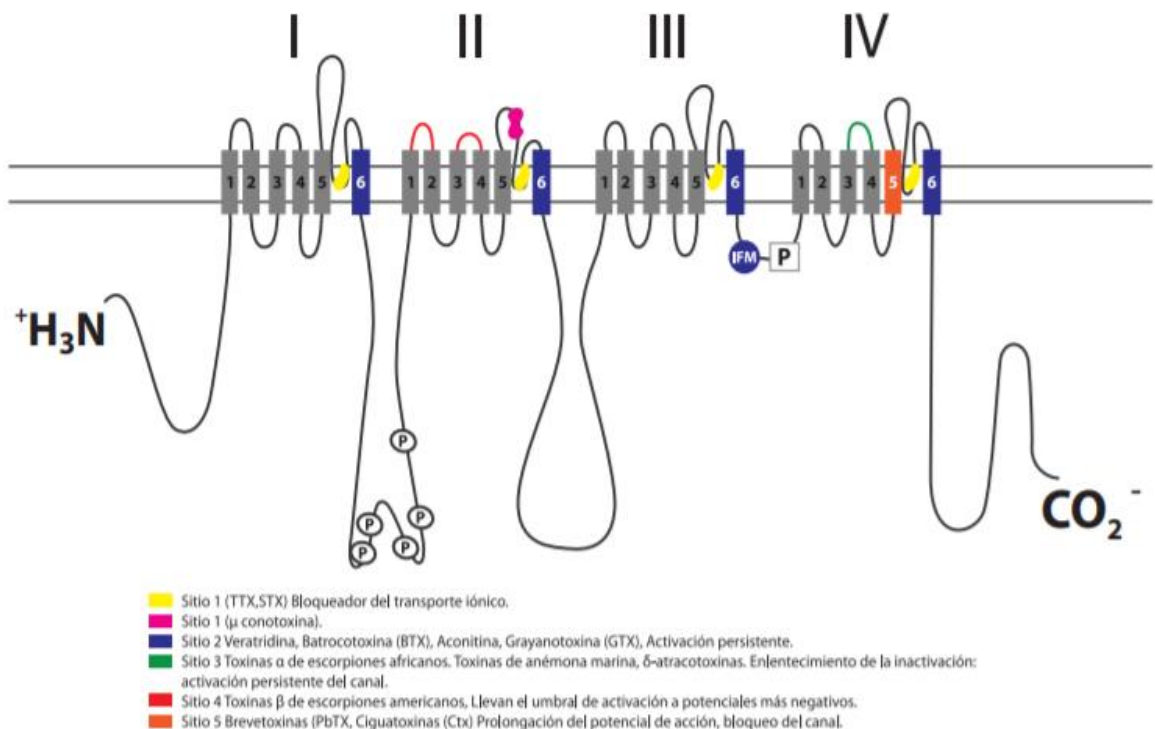
## 2.2 CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS

Existen diversas toxinas biológicas producidas por animales y plantas que ejercen su efecto modificando las propiedades de los canales de sodio. De acuerdo a cómo alteran la función del canal, se clasifican en toxinas bloqueadoras del poro, toxinas que modifican la compuerta de activación uniéndose a sitios intramembranales y toxinas que modifican la compuerta de inactivación uniéndose a sitios extracelulares (Marban et al., 1998).

Las toxinas como TTX y STX actúan en la superficie extracelular del canal bloqueando su activación en el sitio de unión 1, al igual que la  $\mu$ -conotoxina, la cual es un inhibidor competitivo de STX en los canales de sodio musculares. En cambio, toxinas como la veratridina y la batracotoxina prolongan la actividad del canal de sodio y reducen la selectividad uniéndose al sitio 2 (Wingard et al., 2012). La unión de toxinas polipeptídicas en el sitio 3, como las de escorpiones del norte de África, anémonas marinas, algunas especies de araña, etc, disminuye la velocidad del proceso de inactivación, por lo que mantiene durante más tiempo la corriente de sodio que se produce por la acción del estímulo eléctrico. Al sitio 4, se unen las toxinas  $\beta$  de escorpiones americanos, como los del género *Centruroides*. Estos péptidos desplazan la dependencia de voltaje del mecanismo de inactivación hacia potenciales más negativos, induciendo actividad neuronal espontánea. Su unión al canal es independiente del potencial de membrana. Algunas toxinas producidas por dinoflagelados, que son organismos unicelulares, como las brevetoxinas (PbTx) y las ciguatoxinas (CTX) liposolubles, cambian el umbral de activación hacia potenciales más negativos y modifican la activación e inactivación; sin embargo, estas toxinas se unen al canal en estado cerrado, modificando la reactivación del canal inactivado, en tanto que la PbTx-3, induce estados de preapertura, generando diferentes estados de apertura. El sitio receptor 5 comprende una parte de los segmentos S5-S6 del dominio IV (Salceda y Ortega, 2009).

Fármacos antiarrítmicos, anticonvulsivos y anestésicos locales, comprenden una familia de inhibidores de canales de sodio que comparten similitudes químicas

y estructurales, los cuales son eficaces en el tratamiento de desórdenes de hiperexcitabilidad debido a su inhibición preferente a canales en estado inactivado (Ahern et al., 2008). Los anestésicos locales bloquean la corriente de sodio y son utilizados en la clínica para tratar síntomas asociados a enfermedades del músculo esquelético, como las miotonías. Disminuyen la excitabilidad de las membranas biológicas, bloqueando canales de sodio, y el bloqueo puede ser tónico o fásico (dependiente de uso) (Catterall, 2000; Ahern et al., 2008).



**Figura 5.** Muestra la localización de los distintos sitios de unión de neurotoxinas descritas. El sitio receptor 1, está formado por dos anillos de residuos aminoacídicos localizados en el asa que forman los segmentos transmembranales s5-s6 en cada uno de los cuatro dominios; el sitio de unión para la  $\mu$ -conotoxina se encuentra en el asa que forman los segmentos IIS5-S6. El sitio receptor 2 se halla en la región S6 de todos los dominios de la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio. El sitio receptor 3 es ocupado por varios grupos de toxinas polipeptídicas que se unen al asa extracelular ubicada entre los segmentos transmembranales IVS3-S4. En el sitio 4 las toxinas interactúan con el segmento extracelular IIS4, segmento que en el estado activado interactúa con el asa formada por los

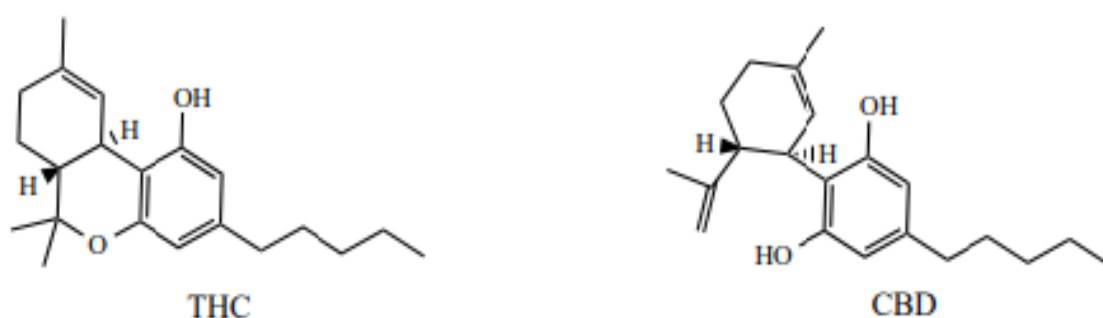
segmentos S3-S4. La brevetoxina y las ciguatoxinas se unen al sitio receptor 5, interactuando con los segmentos transmembranales IS6 y IVS5 (Salceda y Ortega, 2009).

### 3. CANNABINOIDES

*Cannabis sativa*, una planta conocida más comúnmente como marihuana, se ha vuelto muy popular debido a que produce estados psicológicos y eufóricos en los individuos que ingieren o fuman la planta. Pertenece a la familia *Cannabaceae* (*Magnoliopsida, Urticales*) y contiene más de 460 compuestos químicos diferentes, de los cuales más de 60 están agrupados bajo el término “cannabinoides”, que hace referencia a las sustancias que tienen una estructura carbocíclica de 21 carbonos; se han podido aislar más de 100 cannabinoides diferentes de *C. sativa*. La cannabis ha sido muy utilizada por sus efectos medicinales y psicotrópicos (Bruni, et al, 2018). Los cannabinoides que causan estos efectos también tienen aplicaciones potenciales para la salud; se ha visto que mejoran una variedad de síntomas como dolor neuropático, convulsiones, daño cerebral por accidente cerebrovascular y función pulmonar en la enfermedad pulmonar inflamatoria (Andre, et al, 2016).

Se logró aislar y determinar la estructura principal responsable de las propiedades psicoactivas de la planta, el  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) por Gaoni y Mechoulam en el año de 1964. Luego, en 1988, Devane y colaboradores encontraron y describieron el receptor específico de este cannabinoide, el receptor CB1, y más tarde, el receptor cannabinoide tipo 2 (CB2). Los receptores CB1 y CB2 pertenecen a una familia de siete receptores acoplados a proteínas G, que se expresan ampliamente y se distinguen por sus funciones específicas, localización y mecanismos de señalización. Son una de las vías de señalización de lípidos neuromoduladores endógenos denominada “sistema endocannabinoide”, que consta de receptores cannabinoides, ligandos endógenos de receptores cannabinoides (endocannabinoides) y enzimas que regulan la biosíntesis e inactivación de endocannabinoides. Este sistema de señalización de lípidos está involucrado en muchas funciones importantes en el sistema nervioso central y periférico y en los sistemas endocrino e inmunológico (Morales, et al, 2017).

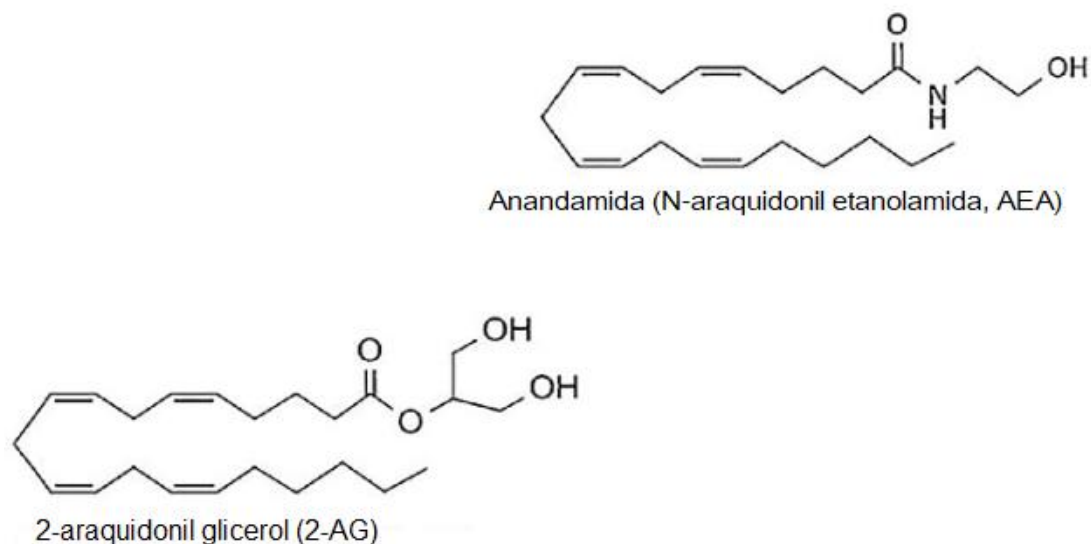
Se puede clasificar a los cannabinoides en tres grandes grupos: fitocannabinoides, endocannabinoides y cannabinoides sintéticos, que comparten ciertas similitudes debido a su naturaleza. Los fitocannabinoides aparecen únicamente en la naturaleza en la especie *Cannabis sativa*; se han podido descubrir alrededor de 120 constituyentes activos en este grupo. Entre los principales fitocannabinoides están el  $\Delta^9$  tetrahidrocannabinol (THC) que se relaciona con el compuesto psicoactivo de la planta y el cannabidiol (CBD), que es un cannabinoide no psicoactivo (Morales, et al, 2017).



**Figura 6.** Estructura química de los principales fitocannabinoides encontrados en *Cannabis Sativa* (Bruni, et al, 2018).

Los organismos vivos también sintetizan biológicamente sus propios cannabinoides, llamados endocannabinoides, que interactúan con el organismo mediante el sistema endocannabinoide (ECS); está compuesto por dos receptores, CB1 y CB2. Los receptores CB1 están principalmente distribuidos en el sistema nervioso central, mientras que los CB2 están presentes principalmente en las terminales nerviosas periféricas y en las células inmunitarias. Los endocannabinoides están compuestos por ácidos grasos poliinsaturados que imitan la mayoría de los efectos del tetrahidrocannabinol, el ingrediente activo de la planta de marihuana *Cannabis sativa*. Los dos endocannabinoides mejor descritos y estudiados son la N araquidonoil etanolamida (AEA), o anandamida, y la 2 araquidonilglicerol (2-AG) (Di Marzo et al., 2005). En los últimos años, una amplia investigación centrada en las acciones biológicas de estos compuestos indicó que

los endocannabinoides tienen importantes funciones reguladoras en varias condiciones fisiológicas y patológicas (Di Marzo et al., 2005; Pertwee et al., 2010).



**Figura 7.** Estructura química de los endocannabinoides más estudiados en la naturaleza (Kytikova, et, al, 2019).

En cambio, los cannabinoides sintéticos son sustancias similares, o completamente diferentes, a los fitocannabinoides y los endocannabinoides y, a diferencia de ellos, son totalmente sintéticos y creados en laboratorio. Entre ellos encontramos el ácido ajulémico (AJA), que es un derivado sintético del ácido  $\Delta^9$ -THC-11-oico, un metabolito principal de  $\Delta^9$ -THC (Foadi et, al. 2014); junto con otros cannabinoides sintéticos, se busca investigar con fines terapéuticos para el tratamiento del dolor, entre otras afecciones. AJA induce efectos antiinflamatorios y analgésicos en modelos de dolor agudo y neuropático en roedores (Foadi et al., 2014). Aunque aún no se han superado los ensayos clínicos necesarios para demostrar que resultan seguros para el consumo, hay una gran ventana de oportunidad para continuar con los trabajos de investigación y así lograr el desarrollo de futuros fármacos.

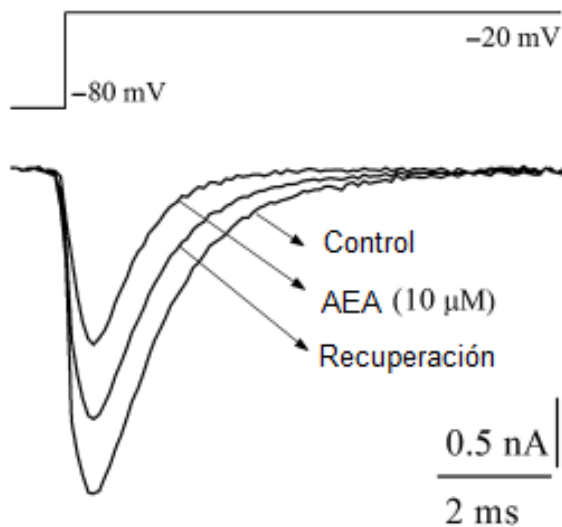
### 3.1.1 EFECTO DE LOS CANNABINOIDES EN CORRIENTES DE SODIO

Debido a su papel central en la conducción rápida de impulsos eléctricos, los canales de  $\text{Na}^+$  han demostrado ser dianas valiosas para el tratamiento terapéutico del dolor crónico, la epilepsia y las arritmias cardíacas, entre otras afecciones (O'Leary, 2017). Entre estas moléculas podemos mencionar a los ligandos cannabinoides, los cuales han revelado tener efecto con potencial importancia para la analgesia (Watkins, 2019).

En los últimos años se ha podido describir una parte de los efectos que ejercen los ligandos cannabinoides sobre corrientes de sodio, en especial sobre los canales pertenecientes a la súperfamilia de los  $\text{Na}_v$ s. Entre los endocannabinoides mejor descritos encontramos a la molécula de anandamida, con estructura similar al lípido cis-9,10-octadecenoamide (cOA) estudiado por Nicholson y colaboradores en 2001, y que tiene propiedades inhibitoras sobre canales de sodio (Mendelson et al., 1999). Existen dudas acerca de su mecanismo de acción, ya que en lugar de ejercer sus efectos por medio de receptores a cannabinoides como el CB1 Y CB2, parecen interactuar de forma directa e indirecta con los canales dependientes de voltaje.

En 2003 se realizaron pruebas con anandamida, AM 404 y WIN 55, 212-2 (cannabinoides sintéticos) por Nicholson y colaboradores, quienes demostraron que los canales de sodio de sinaptosomas de cerebro de ratón son inhibidos por dichos cannabinoides de manera reversible, produciendo la reducción de la excitabilidad neuronal; esto abrió una ventana grande de posibilidades terapéuticas (Nicholson et al., 2003). Se encontró más tarde que el éter 2-AG, un endocannabinoide, disminuye la corriente máxima de  $\text{Na}^+$  en las células paratiroides de rana que no expresan CB1 y CB2. Estos datos igual sugieren que los cannabinoides pueden interactuar con otras estructuras, además de sus respectivos receptores, específicamente con los canales iónicos (Okada, 2005).

Al Kury y colaboradores demostraron en 2014 que AEA, a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , antes ya probada con canales de sodio (Duan et al., 2008), inhibe la corriente del canal de sodio dependiente de voltaje así como la de los canales de calcio tipo-L en los miocitos del ventrículo de rata, independientemente de la activación de los receptores CB1 y CB2 ya que, como fue descrito, expresan en corazón de rata (Bouchard et al., 2003). Para sus propósitos escogieron dos antagonistas de estos receptores, AMP251 y AM630. Sus resultados sugirieron que anandamida reduce la amplitud de las corrientes de sodio de VGSC, efecto que no es mediado por los receptores naturales de los endocannabinoides (Al Kury et al., 2014).

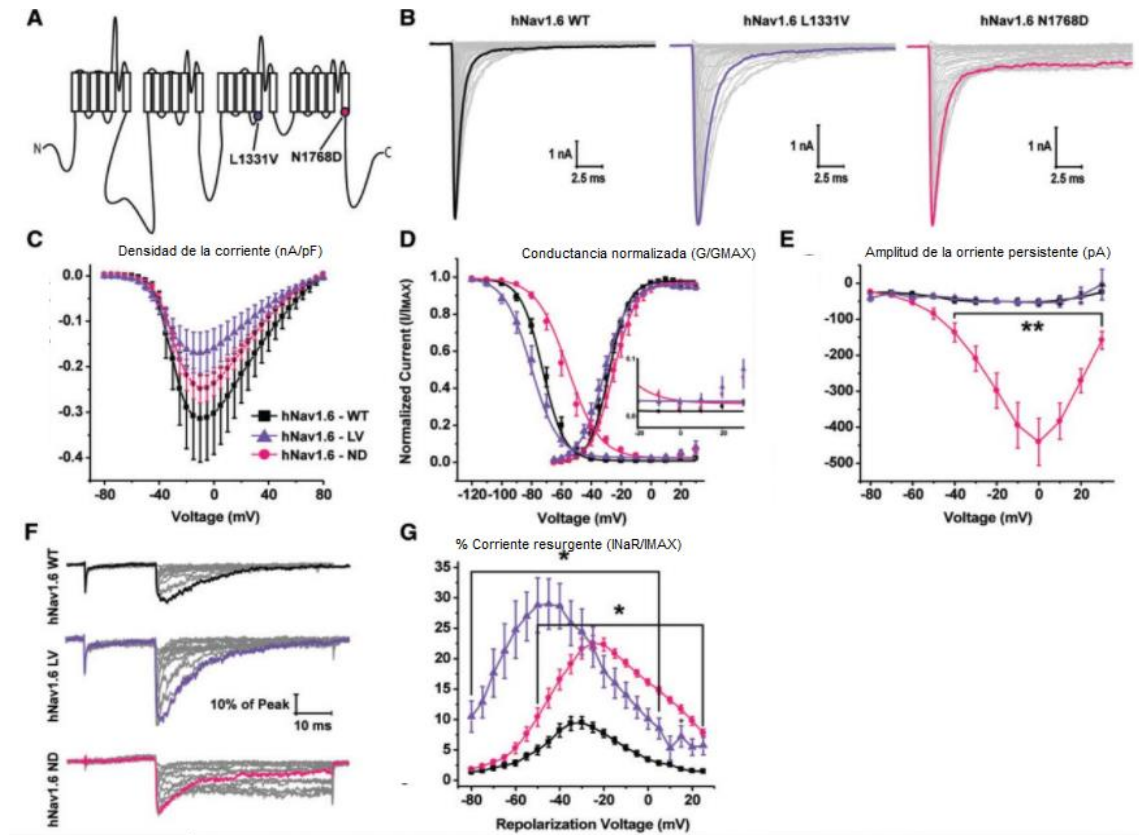


**Figura 8.** Muestra los registros de las corrientes de sodio de miocitos ventriculares antes, durante y después de la aplicación de 10 min de AEA [10  $\mu\text{M}$ ].  $\text{I}_{\text{Na}}$  se registró durante pulsos de voltaje de 50 ms a -20 mV desde un potencial de retención de -80 mV (Al Kury et al., 2014).

En los músculos cardíacos, los VGSC están representados casi exclusivamente por su isoforma  $\text{Nav}1.5$  resistente a TTX (Catterall et al., 2005). Por lo tanto, los cambios en las propiedades biofísicas de  $\text{I}_{\text{Na}}$  por AEA, pueden atribuirse a sus efectos sobre la compuerta del canal  $\text{Nav}1.5$  (Al Kury et al., 2014). En ese mismo año, Okura y colaboradores decidieron probar el mismo endocannabinoide sobre canales de sodio en cuatro canales neuronales:  $\text{Nav}1.2$ , 1.6, 1.7 y 1.8. Buscaron la concentración inhibitoria media y demostraron que suprime las isoformas expresadas en ovocitos de *Xenopus laevis*, confirmando nuevamente que el efecto supresor es independiente de receptores de

cannabinoides mediante el uso de antagonistas de los mismos receptores (Okura, 2014).

Trabajos de Patel y colaboradores demostraron que la molécula conocida como CDB ejerce sus efectos sobre canales  $Nav$  1.6 WT (wild type) y mutantes relacionados con epilepsia que generan aumento de la corriente resurgente, principalmente ganancia de función; el pico de la corriente resurgente es inhibido significativamente por el cannabidiol. La inhibición de la corriente persistente ocurre dentro del mismo rango de voltaje que la inhibición de la corriente resurgente y probablemente contribuya a la reducción de la corriente resurgente (Figura 9). La corriente de sodio resurgente se encuentra cercana al umbral y surgen de la reapertura del canal durante la repolarización, se predice que aumenta la excitabilidad neuronal, mientras que la corriente persistente es una corriente que no se inactiva (o que se inactiva muy lentamente), puede amplificar las corrientes subumbrales y facilitar disparos repetitivos. En general, el cannabidiol altera múltiples propiedades biofísicas de los canales mutantes de  $Nav$  1.6 en formas que son consistentes con la disminución de la actividad del canal. Estos efectos fueron reproducibles en células HEK293T y en neuronas estriatales de ratón. (Patel et al., 2016).

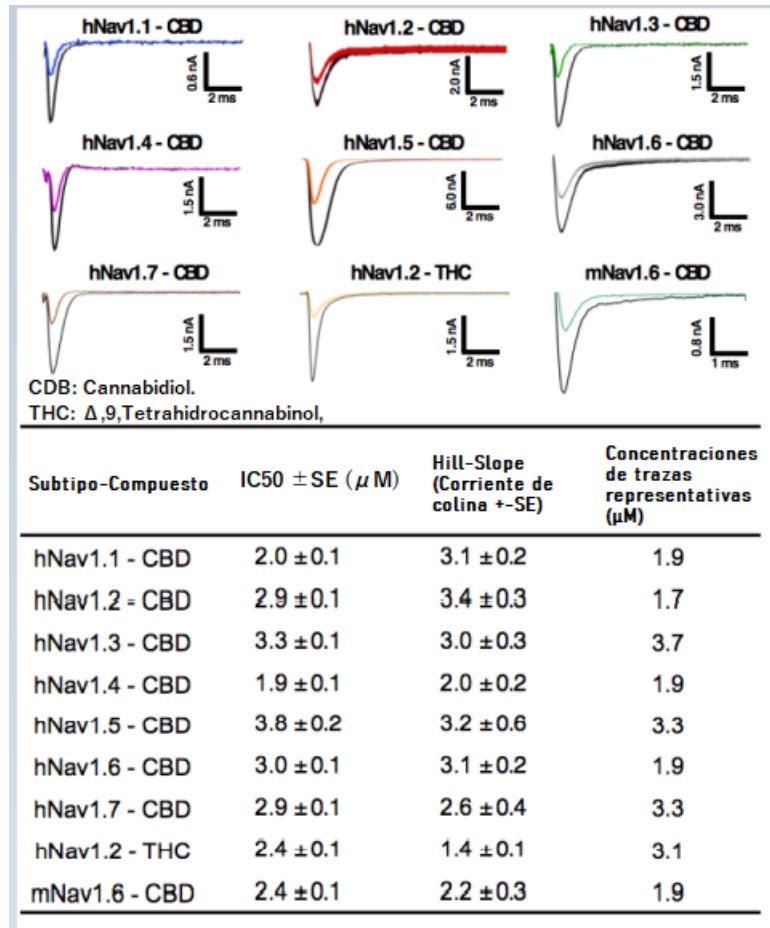


**Figura 9.** **A)** Esquema lineal de la estructura de la subunidad  $\alpha$  de VGSC que representa las ubicaciones de las mutaciones hNav 1.6 L1331V (círculo púrpura) y N1768D (círculo rosa). **(B)** Familia representativa de corrientes generadas por células HEK293T que expresan los canales hNav 1.6 (WT), L1331V y N1768D. Los trazos de corriente máxima están en negro. **(C)** Gráfico de densidad de corriente contra voltaje. **(D)** Las curvas de activación e inactivación en estado estacionario se ajustan a una función de Boltzmann. Recuadro: ampliación de la curva de inactivación dependiente del voltaje entre -20 mV y +30 mV que muestra la inactivación incompleta de los canales mutantes. **(E)** Amplitud máxima de la corriente persistente representada en función del voltaje. **(F)** Familia representativa de trazos de corriente resurgente generadas por hNav 1.6 WT (*arriba*), L1331V (*centro*) y N1768D (*abajo*). Las trazas de la corriente resurgente máxima están en negro. **(G)** Porcentaje de corriente resurgente representada en función del voltaje de repolarización para hNav 1.6 WT (cuadrados negros;  $n = 20$ ), L1331V (triángulos violetas;  $n = 11$ ) y N1768D (círculos rosas;  $n = 14$ ) (Patel et al., 2016)

Registros realizados por Ghovanloo y colaboradores han descrito efectos inhibidores de esta molécula sobre canales de sodio  $Na_v$  1.1 al 1.7, probados en

células HEK-293 y neuronas iPSC. Se ha observado que CBD, además de disminuir la corriente de sodio, mejora la potencia de inhibición del canal a temperaturas más bajas. Al realizar una mutación en el poro, en el sitio de unión a anestésicos locales (AL) F1763A y compararlo con un canal WT se observó que el efecto disminuye, pero no por completo, lo que les llevó a pensar que el sitio de unión se encuentra en el poro, cerca del sitio de unión a AL, pero no en el mismo lugar; el *docking* realizado respalda la evidencia acerca de que la molécula interactúa con el poro del canal. Por tanto resultados indican que CBD estabiliza el estado inactivo, ya que ocurre una hiperpolarización del canal, esto sin alterar la dependencia del voltaje de activación (Ghovanloo et al., 2018).

Además del mecanismo de interacción con el poro, se ha descrito que CBD, por su naturaleza anfifílica, tiende a localizarse en la interfase líquida de la bicapa alterando las propiedades de la membrana, (como la curvatura y el estado de rigidez) al insertarse en el núcleo de las bicapas, manteniendo por consecuencia a los canales de sodio en estado inactivo (Ghovanloo et al., 2018). El mecanismo de acción sugerido por estos experimentos suma evidencia acerca de otra forma de interacción de los cannabinoides con los canales de sodio; se propone que el CBD, como inhibidor de  $Na_v$ , sufriría las mismas limitaciones que bloqueadores clásicos del poro. Además, al menos en parte debido a su hidrofobicidad, el CBD modula una gama más amplia de objetivos que los bloqueadores  $Na_v$  tradicionales (Ghovanloo et al., 2018).



**Figura 10.** Se muestran trazas de corriente representativas a concentraciones de IC<sub>50</sub> aproximadamente para cada subtipo probado con CBD (Cannabidiol) para canales hNav 1.1-1.6 y mNav 1.6 así como también se probó THC (Δ-Tetrahydrocannabinol) en el canal hNav 1.2. Se muestra la corriente de sodio sin fármaco en trazo color negro, mientras que con el fármaco se muestra en colores diferentes. Abajo, tabla de los parámetros que muestra las IC<sub>50</sub> y las pendientes de Hill (n = 3-15). SE = error típico). Aunque la potencia de la inhibición de la corriente de sodio entre el THC y el CBD es similar, la pendiente Hill asociada con el THC es menos pronunciada (hNav 1.2), esto puede indicar que el THC tiene algunas diferencias en el mecanismo de inhibición de la corriente de sodio que el CBD. (Ghovanloo et al., 2018).

Cada vez se conoce mejor los mecanismos de acción de los cannabinoides en canales neuronales; sin embargo, es clara la importancia de conocer y describir los mecanismos que se relacionan con otras isoformas como el canal Nav 1.4, el

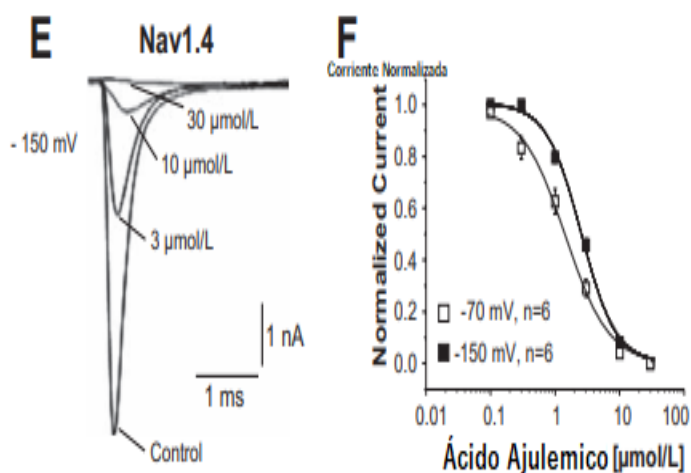
cual se encuentra principalmente en el sarcolema y en las membranas del túbulo T de las fibras del músculo esquelético (Goldin, 2001).

#### 3.1.1.1 EFECTOS DE CANNABINOIDES DESCRITOS EN EL CANAL NAV 1.4

Algunos fármacos específicos como la mefloquina o la primaquina tienen un efecto inhibitorio de la corriente del canal  $Na_v$  1.4; así mismo, ejercen un efecto modulador de forma independiente del voltaje y de forma dependiente de la concentración, y su comportamiento, que es similar al de otros fármacos bloqueadores de canales, como TTX (Armstrong, 1999), se asemejaría en parte al provocado por cannabinoides en isoformas del canal de sodio presentes en el sistema nervioso central, al inhibir corrientes catiónicas. Además de inhibir las corrientes de sodio, estos fármacos retrasaron significativamente la inactivación rápida sin afectar la recuperación de la inactivación, desplazando a potenciales más hiperpolarizados la curva de inactivación (Paiz-Candia et al., 2017; Salinas-Stefanon et al., 2011). Esto lleva a cuestionarnos si la modalidad de acción de la mayoría de cannabinoides sigue mecanismos semejantes de inhibición de la corriente.

Los efectos electrofisiológicos ocasionados por estas moléculas en diferentes isoformas de la familia de los  $Na_v$ s han sido estrechamente relacionados debido a la similitud que presentan, al ser expresados individualmente, así como en una célula que expresa diferentes subtipos, se observa el efecto de disminución en la corriente de sodio en las diferentes isoformas (Ghovanloo et al., 2018). Particularmente en canales de sodio dependientes de voltaje presentes en el sistema nervioso periférico como el  $Na_v$  1.4, la evidencia sobre los efectos electrofisiológicos relacionados con dichos fármacos es menor, sin embargo algunos efectos descritos del canal han sido posible gracias al empleo de técnicas específicas que van desde el registro electrofisiológico hasta la técnica de *docking* molecular. Esta evidencia podría ser aplicable en terapias contra enfermedades ocasionadas por mutaciones puntuales en canales del músculo esquelético.

El ácido ajulémico (AJA) es un derivado sintético de  $\Delta 9$ -ácido THC-11-oico, un metabolito principal de  $\Delta 9$ -THC. Se conoce que AJA induce efectos antiinflamatorios y analgésicos en modelos de dolor neuropático en roedores (Dyson A, 2005). El estudio de los efectos de AJA *in vitro* en canales de sodio, específicamente en las subunidades  $\alpha$  en todas las isoformas  $Na_v1.2$ ,  $1.3$ ,  $1.4$ ,  $1.5$ ,  $1.5N406K$ ,  $1.5F1760A$  y  $1.8$ ,  $Na_v1.4$ ,  $Na_v1.5$  y  $Na_v1.7$  identificó al cannabinoide sintético AJA como un potente bloqueador de los canales de sodio activados por voltaje. Esta inhibición depende de la concentración y del estado del canal, propiedades que AJA comparte con otros cannabinoideos. La inhibición es reversible y dependiente de la concentración en todas las isoformas, incluyendo la de  $Na_v1.4$  (Figura 10), además de inducir un fuerte cambio hiperpolarizante de la dependencia del voltaje de la inactivación rápida. Sin embargo, los efectos inhibitorios están mediados por mecanismos distintos del sitio de unión de anestésicos locales. AJA no solo es un fármaco interesante con implicaciones para el tratamiento del dolor, sino también como una herramienta para explorar más a fondo una ruta aún mal definida para inhibir canales de sodio dependientes de voltaje en mutaciones puntuales que alteren su naturaleza (Foady, 2014).

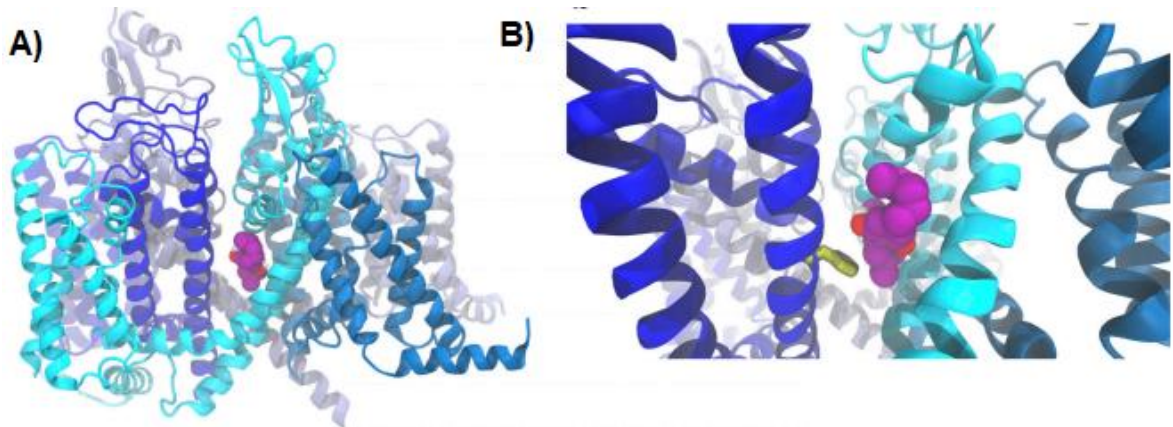


**Figura 11.** Efecto de inhibición dependiente de la concentración de AJA probado sobre el canal  $Na_v1.4$ . Bloqueo dependiente de la concentración en reposo (cuadrados llenos) e inactivado (cuadrados vacíos) (Foady 2014).

El CBD es uno de los compuestos no psicoactivos de la planta de *cannabis* que ha despertado gran interés debido a efectos regulatorios sobre corrientes de sodio, mediadas por canales dependientes de voltaje. Se cree que el CBD puede tener un valor terapéutico contra la hiperexcitabilidad de  $Na_v1.4$ . Se ha sugerido que es un compuesto potencialmente terapéutico contra una variedad de afecciones, incluidos los espasmos musculares, el dolor y las convulsiones. Algunos informes sobre la eficacia del CBD son anecdóticos, mientras que otros se han comprobado experimental y clínicamente. Demostró su eficacia terapéutica en un reciente ensayo clínico de fase III en humanos contra los síndromes de Dravet y Lennox Gastaut, formas graves de epilepsia infantil (Devinsky et al., 2017). Se ha propuesto un mecanismo por el cual el CBD podría inhibir los  $Na_v$ s mediante mecanismos directos (interacciones directas / de unión con el canal) e indirectos (mediados por membrana) (Ghovanloo, 2021).

Estudios cristalográficos de la interacción del CBD con el canal de sodio  $Na_vMS$  (canal de sodio de *M. Marinus*) han permitido conocer un sitio novedoso de interacción a través de las fenestraciones y la cavidad hidrofóbica del canal que bloquea el paso del sodio; se pudo observar de igual manera que el sitio de interacción de la molécula es cercano al sitio de AL (Sait, 2020). La evidencia acerca cada vez más las posibilidades terapéuticas contra afecciones relacionadas al aumento de la excitabilidad de los canales de sodio dependientes de voltaje característicos de estas afecciones (Devinsky, 2017). Ghovanloo, en 2021 describió un efecto bifásico inusual del CBD sobre la organización de la cadena de la membrana, lo que sugiere que las moléculas se insertan en la región hidrófoba de la membrana y tienden a localizarse cerca de la interface lípido-agua, ordenando metilenos de la cadena de acilo cercana y permitiendo una densidad de empaquetamiento reducida y una mayor fluidez de la membrana en extremos de las cadenas de acilo. Los resultados de MD y NMR mostraron que el CBD aumenta el parámetro de orden del núcleo de la bicapa, lo que tendería a hacer que las bicapas sean más gruesas y menos elásticas, haciendo que el CBD inhiba la formación de canales conductores; de hecho, aumenta la rigidez o el grosor de la bicapa, por tanto, reduce la elasticidad de la bicapa lipídica.

Otra de las interacciones descritas en este estudio nos muestra al CBD acoplado al poro  $\text{Na}_v1.4$  en su posición de unión más favorable, lo que respalda una posible interacción cercana al sitio de unión a AL. Mediante *docking* y una mutación del sitio de unión a AL (F1586A) (Figura 12) se pudo visualizar que CDB comparte características de bloqueo similares a las de fármacos como la lidocaína. Por lo que se podría sugerir que el CBD interactúa con  $\text{Na}_v1.4$  a través de las fenestraciones, provocando su entrada en su sitio de unión en el poro a través de dichas aberturas. La desestabilización del sitio LA por la mutación F1586A redujo el bloqueo de CBD de  $\text{Na}_v1.4$ . Este resultado es particularmente notable porque el sitio de AL se convierte en un sitio de interacción más favorable cuando el canal adopta un estado más inactivo. Por lo tanto, el bloqueo reducido de CBD en F1586A en reposo podría respaldar la idea de que CBD interactúa con  $\text{Na}_v$  en el poro. Sin embargo, esto no indica que el poro sea el principal determinante de la inhibición del CBD.

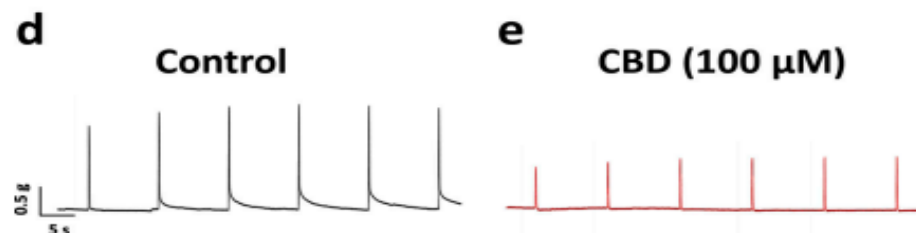


**Figura 12.** Interacciones  $\text{Na}_v 1.4$  WT con CBD. CBD ilustradas en la estructura  $\text{Na}_v1.4$  humana mediante acoplamiento molecular (*docking*). A) Bloqueo del poro  $\text{Na}_v 1.4$  por CBD; F1586A reduce la inhibición de la corriente. B) Vista lateral del CBD acoplado al poro de la estructura  $\text{Na}_v1.4$  humana. La estructura está coloreada por dominio. DIV está coloreado en azul profundo. Vista lateral ampliada en la que F1586 es de color amarillo. (Ghovanloo, 2021).

El CBD también ralentiza la recuperación de  $\text{Na}_v1.4$  desde la inactivación, lo que sugiere que tarda más en salir de los canales que el tiempo que tardan los canales en recuperarse de la inactivación; al ralentizar la recuperación de la inactivación, respalda la idea de que el CBD estabiliza los estados inactivados.

Debido a que el CBD ha demostrado su efecto terapéutico contra los trastornos convulsivos (Devinsky et al., 2017), se ha buscado examinar si puede mejorar de manera similar una afección de GOF (ganancia de función) del músculo esquelético (Cannon, 2015). Una investigación con un canal mutado que desarrolla a un fenotipo de parálisis periódica, P1158S en  $Na_v1.4$ , evidenció un aumento en la sensibilidad al pH del canal (Ghovanloo et al., 2018). Más tarde la misma mutación exhibió efectos del CBD sobre la hiperexcitabilidad del músculo esquelético, sin cambio en la activación, pero hiperpolarizó la inactivación y ralentizó la recuperación de la inactivación. También redujo la INa persistente exacerbada asociada con P1158S a un pH de 7.4. (Ghovanloo et al., 2021). Al producir esta incapacidad para repolarizar mantiene a los  $Na_v$  en un estado inactivo, lo que puede sugerir un alivio del fenotipo de la mutación (Cannon, 2015).

Estudios *ex vivo* han demostrado también que el CBD reduce las contracciones del músculo esquelético (Figura 13), dato que se pudo comprobar al extirpar quirúrgicamente los músculos del diafragma de rata y midiendo las contracciones musculares provocadas por la estimulación del nervio frénico, razonando que si el CBD reduce la contracción muscular, una concentración de saturación debería proporcionar una respuesta lo suficientemente grande como para detectar cualquier reducción potencial en la contracción. Los resultados mostraron que el CBD reduce la amplitud de la contracción a ~60 % del control. Estos datos muestran que una inhibición selectiva de  $Na_v$  reduce la contracción del músculo esquelético, lo que sugiere que la reducción de la contracción muscular por parte del CBD podría deberse, al menos en parte, a su efecto sobre  $Na_v$  (Ghovanloo et al., 2018).



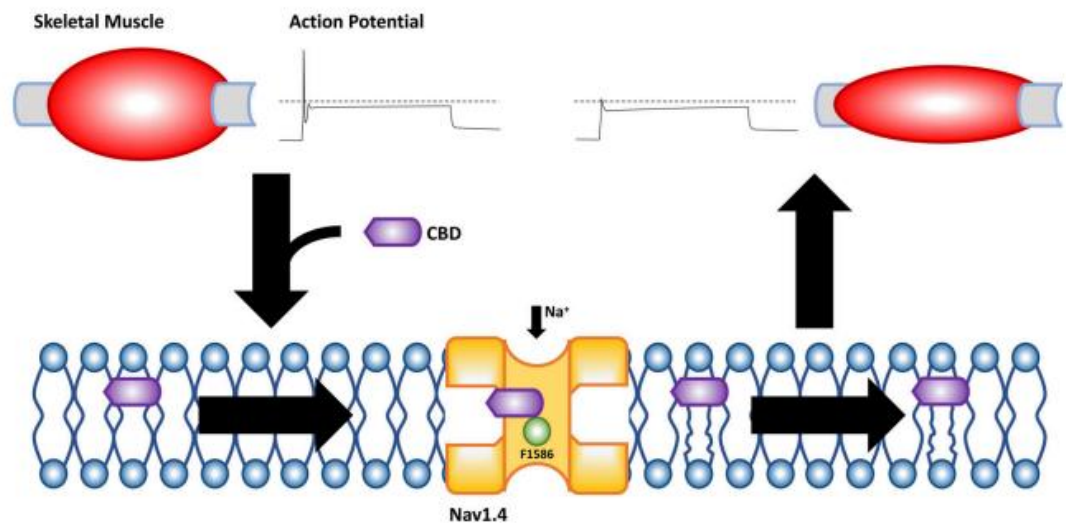
**Figura 13.** Muestra de trazas de contracción en condiciones control y fármaco.

Descubrimientos adicionales mediante el ensayo de fluorescencia basada en gramicidina (GFA) sugirieron que el CBD cambia la elasticidad de la membrana de una manera dependiente de la concentración (1–30  $\mu\text{M}$ ); así como también se observó que los efectos del CBD mejoraron a temperaturas más bajas. La inhibición de las corrientes  $\text{Na}_v$  por CBD está, al menos en parte, mediada por el cambio de la elasticidad de la bicapa lipídica. Una característica común entre todos estos canales es que se asocian directamente con la membrana lipídica en la que se expresan, y los cambios en la fluidez de la membrana alteran los cambios conformacionales entre sus estados conductores (abiertos) y no conductores (cerrados) (Anderson et al., 1999), por lo que los cambios en la propia membrana tienen un efecto "indirecto" sobre la función del canal. Una posible hipótesis con respecto a las interacciones cannabinoideas es que podrían alterar las propiedades de la bicapa lipídica.

Estos descubrimientos sugieren que puede haber dos, posiblemente tres, mecanismos involucrados. Los mecanismos exactos a través de los cuales la presencia de CBD puede alterar las interacciones lípido- $\text{Na}_v$  deben investigarse más a fondo en estudios futuros. El bloqueo en estado de reposo ocurre cuando un compuesto ingresa desde la fase lipídica de la membrana al sitio de unión a AL, mientras que el bloqueo rápido en estado abierto ocurre cuando un compuesto ingresa al poro abierto desde el citosol (Hille, 1977). Un estudio reciente mostró de igual manera que los compuestos pueden tener acceso directo desde la fase de membrana al sitio de AL a través de fenestraciones de canales, que culminan en el bloqueo en estado de reposo (Gamal El Din et al., 2018). Algunas características de la inhibición de  $\text{Na}_v$ s por CBD son similares a las de los bloqueadores de poro clásicos (Ghovanloo et al., 2018). Resultados funcionales y computacionales en este estudio, junto con hallazgos estructurales previos que describen la unión del CBD dentro del poro  $\text{Na}_v\text{M}$  (Sait et al., 2020) en la interfase fenestración-poro, sugieren que la vía del CBD para el bloqueo de  $\text{I}_{\text{Na}}$  es más probable a través del fase lipídica intramembrana. Finalmente, mientras que el bloqueo de  $\text{I}_{\text{Na}}$  por CBD parece ocurrir a través de sus interacciones dentro del poro  $\text{Na}_v1.4$ , su estabilización de la inactivación podría al menos en parte surgir de la modulación de la elasticidad de la membrana; sin embargo, la naturaleza exacta y el mecanismo a través del

cual se produce esta estabilización por inactivación siguen sin resolverse. Ambos mecanismos de bloqueo del poro y estabilización de la inactivación parecen contribuir a la inhibición de las corrientes  $Na_v$  por el CBD.

En conclusión, la inhibición de  $Na_v$  por el CBD tiene al menos dos componentes: bloqueo físico del poro y efectos indirectos como la modulación de la elasticidad de la membrana, o propiedades de la bicapa. La inhibición de  $Na_v$  1.4 podría contribuir a que el CBD reduzca las contracciones del músculo esquelético y podría tener un valor terapéutico potencial contra la miotonía, y posiblemente, en menor medida, contra la parálisis periódica. Desde una perspectiva más amplia, puede ser válido para otros compuestos que son similares al CBD en la modulación de los canales de navegación u otros canales con estructuras similares (Ghovanloo, 2021).



**Figura 14.** Vía de inhibición del músculo esquelético a través de  $Na_v$  1.4. Una vez que el músculo esquelético se expone al CBD, dada su alta lipofilia, la mayor parte ingresa al sarcolema. Al entrar en el sarcolema, se localiza en las regiones medias de la bicapa y viaja a través de las fenestraciones de  $Na_v$  1.4 hacia el poro. Dentro de la mutación de los poros de AL, F1586A, reduce la inhibición del CBD. El CBD también altera la elasticidad de la membrana, lo que promueve el estado inactivado del canal  $Na_v$ , lo que se suma a los efectos inhibitorios generales del CBD. El resultado neto es una excitabilidad eléctrica reducida del músculo esquelético, que, al menos en parte, contribuye a una reducción de la contracción muscular (Ghovanloo, 2021).

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

#### 4. ¿POR QUÉ ES IMPORTANTE EL CANAL DE SODIO $Na_v$ 1.4?

El canal  $Na_v$  1.4 permite, en condiciones fisiológicas, la entrada de sodio desde el espacio extracelular al citosol después de la despolarización de la membrana. El gen SCN4A codifica la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio regulado por voltaje, ubicado en la posición 17q23.3 en el cromosoma 17. El  $Na_v$  1.4 se encuentra principalmente en el sarcolema y en las membranas del túbulo T de las fibras del músculo esquelético (Goldin, 2001). La subunidad alfa del canal forma un poro a través de membranas que consta de seis segmentos (S1-S6), que se repiten en los dominios (I-IV) cuatro veces. Esta proteína media la permeabilidad a los iones de sodio dependiente del voltaje de las membranas excitables.

$Na_v$  1.4 es la isoforma más abundante en el músculo esquelético, y se ha observado su expresión a niveles más bajos en el músculo esquelético neonatal (Catterall, 2014). Su función principal es controlar la excitabilidad de las fibras musculares al iniciar el potencial de acción. La corriente entrante del tejido esquelético es semejante a la que fue descrita en el axón gigante de calamar por Hodgkin y Huxley en 1952. En condiciones fisiológicas la corriente se activa alcanzando su pico máximo aproximadamente a -20 mV en menos de 1 ms, y se inverte aproximadamente a + 50 mV, y la inactivación tiene, al igual que en otras isoformas, un componente rápido y otro lento (Hodgkin y Huxley, 1952). Se ha demostrado que el canal  $Na_v$  1.4 es sensible a TTX, el bloqueador clásico de los canales de sodio, debido a que es necesaria una concentración de 5 nM para reducir en un 50 % la corriente (Hille, 2001, Catterall, 2005).

Se ha descrito que mutaciones en este canal pueden causar parálisis periódica hipercalémica, paramiotonía congénita y miotonías agravadas por potasio (Catterall et al., 2005). Los defectos en SCN4A son la causa de paramiotonía congénita de von Eulenburg, paramiotonía sin parálisis por frío, parálisis periódica hipopotasémica y parálisis periódica hiperpotasémica, todas son enfermedades autosómicas dominantes de los canales de sodio caracterizados por debilidad o rigidez muscular debido a excitabilidad alterada.

#### 4.1.1 MECANISMO DE ACOPLE EXITACIÓN-CONTRACCIÓN

El mayor porcentaje de músculo esquelético lo encontramos insertado en los huesos que mueven, de ahí su nombre. Estos músculos se rigen bajo el control voluntario y pueden contraerse mediante órdenes conscientes. Las fibras musculares se contraen de forma simultánea cuando reciben el estímulo debido a que se organizan en grupos denominados unidades motoras, que son inervadas por ramas de una sola neurona motora (Karp, 2014). El mecanismo crucial para la contracción muscular es conocido como el acoplamiento excitación-contracción y ha sido definido por Alexander Sandow como la secuencia de eventos que ocurre desde que se genera un potencial de acción en la fibra muscular hasta que comienza la generación de tensión (Kahn A, Sandow A, 1952).

Los eventos del acoplamiento excitación-contracción ocurren de manera ordenada; la secuencia comienza con el inicio de un potencial de acción en la membrana por la acción del neurotransmisor acetilcolina liberado en la placa motora por una neurona motora inferior, que origina una despolarización de la membrana de hasta 100 mV, mediante cambios de conductancia dependientes de voltaje, inicialmente por el movimiento del  $\text{Na}^+$ , y luego, con cierto retraso, por el del  $\text{K}^+$  (Cummins, et al., 1996). La despolarización se propaga longitudinalmente a lo largo de la fibra y transversalmente a través de los túbulos T, mediante un proceso regenerativo y dependiente de sodio.

La despolarización y el acoplamiento de los receptores de dihidropiridinas (DHPR) del túbulo T con los receptores de rianodina (RyR) del retículo sarcoplásmico evocan la liberación masiva de calcio al citoplasma, lo cual genera una liberación masiva de  $\text{Ca}^{2+}$ . La interacción del  $\text{Ca}^{2+}$  con la troponina C suspende la inhibición que la troponina I y la tropomiosina ejercen sobre la interacción actina-miosina, lo que permite el deslizamiento de los filamentos delgados sobre los gruesos y genera tensión. Finalmente, se da la activación transitoria del sistema amortiguador de  $\text{Ca}^{2+}$  y la recaptura por el retículo sarcoplásmico, por proteínas citoplásmicas solubles como la parvalbúmina y, finalmente, por la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico (SERCA) (Kahn A, Sandow A, 1952). Así se asegura una rápida relajación del músculo esquelético, de manera que queda listo para responder ante un nuevo estímulo (Calderón, et al., 2009).

Las mediciones de corrientes iónicas de membrana ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , principalmente) y de movimientos de carga intramembrana, han sido de gran interés para el estudio de numerosos aspectos de la fisiología y fisiopatología del músculo esquelético. Como se ha descrito, el canal de sodio dependiente de voltaje  $\text{Nav} 1.4$  se encuentra en un alto porcentaje en el músculo esquelético (Catterall, 2000), y por tal motivo podemos sugerir que es importante en la generación del potencial de acción y que juega un papel crucial en la contracción muscular. La inhibición descrita de  $\text{Nav}1.4$  en trabajos anteriormente mencionados podría contribuir a que el CBD, e incluso otros cannabinoides reduzcan las contracciones del músculo esquelético lo que puede tener un valor terapéutico potencial contra la mionía y posiblemente, en menor medida, contra la parálisis periódica, enfermedades que afectan el mecanismo de excitación-contracción natural del músculo esquelético (Ghovanloo et al., 2021).

#### 4.2 CANALOPATÍAS RELACIONADAS CON EL CANAL $\text{NAV} 1.4$

Existen trastornos genéticos que dan como resultado la alteración en la expresión de ciertos aminoácidos, dando como resultado patologías asociadas a canales iónicos también llamadas canalopatías. Las mutaciones en los genes que

codifican las subunidades  $\alpha$  y las subunidades  $\beta$  de  $Na_v$  pueden afectar la expresión del canal funcional o alterar sus cinéticas; estas canalopatías son específicas y, dependiendo de la isoforma en la que se presenten, será la alteración fisiológica que se desarrollará. En la mayoría de los casos, las canalopatías constituyen enfermedades genéticas autosómicas dominantes en las que las mutaciones causan un efecto tipo ganancia o pérdida de función a nivel molecular y celular (Catterall, 2012). Pueden provocar deterioro neuronal, dolor crónico, patologías neuromusculares, arritmias cardíacas entre otras manifestaciones. Debido a su importancia para la conducción de señales eléctricas, los canales de  $Na^+$  son uno de los objetivos de una amplia variedad de anestésicos locales, fármacos antiarrítmicos, anticonvulsivos y antidepresivos (Lera Ruiz, M. and Richard L. Kraus 2015). En la tabla 2 podemos observar algunos efectos atribuidos a mutaciones en las isoformas de los  $Na_v$ 's.

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

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

Los primeros estudios sobre la patogenia de un trastorno episódico muscular (parálisis periódica) revelaron las primeras mutaciones en un gen (SCN4A) que codifica un canal de sodio dependiente de voltaje del músculo esquelético, Nav 1.4 (Rojas et al., 1991). Desde entonces se han descrito más de 30 mutaciones de SCN4A y se han asociado con trastornos neuromusculares como parálisis periódicas hipo e hiperpotasémicas (hipoPP e hiperPP), paramiotonía congénita (PC), miononías de los canales de sodio (SCM) y síndrome miasténico congénito.

Las anomalías se han podido detectar mediante el análisis de células transfretadas que codifican canales mutados. Uno de los principales defectos que se puede observar es una interrupción de la inactivación rápida. La inactivación del canal puede ser incompleta o ralentizada, esto da como resultado la reapertura de los canales y la acumulación intracelular de Na<sup>+</sup>, que despolariza las células musculares y genera potenciales de acción repetitivos (Yang et al., 1994). Cuando ocurre un aumento en la excitabilidad de la membrana muscular una breve contracción puede conducir a una serie de PA que persiste durante varios segundos después de que finaliza la actividad de la neurona motora, una condición que se percibe como rigidez muscular (Ghovanloo, 2021). La hiperexcitabilidad se presenta clínicamente como rigidez muscular, denominada miononía, que resulta de una contracción involuntaria que persiste durante varios segundos después del estímulo. Sin embargo, si la despolarización continúa, o aumenta la intensidad, se genera una apertura general de los canales de sodio (WT y mutantes) y, por tanto, la parálisis (Cummins et al., 1996).

El trasfondo genético, y tal vez otros factores como el epigenético, pueden influir en la expresión una mutación particular. Las enfermedades causadas por mutaciones de SCN4A pueden diagnosticarse sobre la base de síntomas clínicos peculiares y diagnóstico molecular. Un diagnóstico completo (diagnóstico clínico y molecular) de estos trastornos es importante para informar a los pacientes sobre el pronóstico, orientar la terapia y proponer asesoramiento genético. Un enfoque novedoso en el tratamiento de estas canalopatías son los cannabinoides, moléculas que han demostrado un efecto positivo en las afecciones que incrementan la

excitabilidad de los canales sodio voltaje dependientes, específicamente en la isoforma Nav 1.4, ya que estudios *in silico*, *in vitro* e incluso en *ex vivo* muestran un efecto inhibitor sobre la corriente y la contracción muscular aberrante causada por estas afectaciones (Ghovanloo et al., 2018; Ghovanloo et al., 2021).

## CONCLUSIONES

Los compuestos cannabinoides pueden interactuar con una amplia gama de estructuras aparte de sus receptores naturales; es el caso de los canales de sodio. Los trastornos de hiperexcitabilidad del músculo esquelético han recibido menos atención que los trastornos en otros tejidos, incluido el cerebro. Los fármacos más comúnmente utilizados incluyen compuestos desarrollados para otras afecciones, como los anticonvulsivos y antiarrítmicos. Por tal motivo existe la necesidad de nuevos tratamientos para estas afecciones. Un creciente cuerpo de evidencia demuestra que los cannabinoides son beneficiosos para una variedad de condiciones clínicas. El desarrollo de tales fármacos requiere la realización de ensayos clínicos bien controlados para establecer objetivamente la eficacia terapéutica, los rangos de dosis y la seguridad.

Los trabajos citados sugieren los mecanismos de acción de los ligandos cannabinoides que, según se acumulan en la membrana, alteran su elasticidad, y podrían ingresar en las fenestraciones de  $Na_v$  1.4 y bloquear el poro del canal.

Evidencia anteriormente mencionada confirma una inhibición en la corriente de sodio mediada por el canal  $Na_v$  1.4 producida por interacciones específicas con cannabinoides de forma directa e indirectamente, mediante el bloqueo de poro e interacciones con la membrana. Aunque dilucidar con precisión el mecanismo de acción de estos compuestos requiere de más trabajos de investigación, podemos, con lo que se sabe hasta hoy, afirmar que las corrientes se inhiben de una manera dependiente de la concentración, en la mayoría de veces desplazando la curva de inactivación de  $I_{Na}$  en estado estacionario a potenciales más hiperpolarizados. Este desplazamiento de la curva de inactivación hacia potenciales más negativos disminuye las corrientes de ventana, por lo que es posible que, por este mecanismo, el fármaco module la excitabilidad celular.

## PERSPECTIVAS

- Es necesario realizar más estudios para caracterizar mejor las propiedades farmacocinéticas de algunas moléculas pertenecientes al grupo de cannabinoides, la dosis correcta y las vías de administración para cada condición específica, las ventajas de la coadministración con otras sustancias, etcétera.
- Las investigaciones citadas en el presente trabajo muestran evidencia del bloqueo de canales de sodio en el sistema nervioso central, sugiriendo también efectos moduladores sobre la corriente en canales mutados; sin embargo, existe un menor número de publicaciones relacionadas con el efecto de estas sustancias en el sistema nervioso periférico, por lo que resulta de gran importancia investigar más sobre este aspecto.
- El estudio de los cannabinoides y su relación con el canal  $Na_v$  1.4 puede proporcionarnos nuevos elementos para el entendimiento del mecanismo de acción y posiblemente para el desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas para el tratamiento de patologías relacionadas con el músculo esquelético.
- El desarrollo de enfoques novedosos para rastrear los cambios dependientes del voltaje en el sitio de unión de fármacos vinculados a la compuerta de inactivación del canal conducirá a una mejor comprensión de los cambios dependientes del estado en la unión a estos fármacos.

## BIBLIOGRAFÍA

Ahern, C. A., Eastwood, A. L., Dougherty, D. A., & Horn, R. (2008). Electrostatic contributions of aromatic residues in the local anesthetic receptor of voltage-gated sodium channels. *Circulation research*, 102(1), 86-94.

Andre, C. M., Hausman, J. F., & Guerriero, G. (2016). Cannabis sativa: the plant of the thousand and one molecules. *Frontiers in plant science*, 7, 19.

Armstrong, C. M. (1981). Sodium channels and gating currents. *Physiological reviews*, 61, 644-683.

Armstrong, C. M. (1999). Distinguishing surface effects of calcium ion from pore-occupancy effects in Na<sup>+</sup> channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(7), 4158-4163.

Bendahhou S, Cummins TR, Griggs RC, Fu YH, Ptacek LJ (2001) Sodium channel inactivation defects are associated with acetazolamide-exacerbated hypokalemic periodic paralysis. *Ann Neurol* 50:417–420

Bouchard JF, Lepicier P, Lamontagne D (2003). Contribution of endocannabinoids in the endothelial protection afforded by ischemic preconditioning in the isolated rat heart. *Life Sci* 72: 1859–1870.

Bruni, N., Della Pepa, C., Oliaro-Bosso, S., Pessione, E., Gastaldi, D., & Dosio, F. (2018). Cannabinoid delivery systems for pain and inflammation treatment. *Molecules*, 23(10), 2478.

Brackenbury, W. J., Davis, T. H., Chen, C., Slat, E. A., Detrow, M. J., Dickendeshler, T. L., & Isom, L. L. (2008). Voltage-gated Na<sup>+</sup> channel  $\beta$ 1 subunit-mediated neurite outgrowth requires Fyn kinase and contributes to postnatal CNS development in vivo. *Journal of Neuroscience*, 28(12), 3246-3256.

Calderón-Vélez, J. C., & Figueroa-Gordon, L. C. (2009). El acoplamiento excitación-contracción en el músculo esquelético: preguntas por responder a pesar de 50 años de estudio. *Biomédica*, 29(1), 140-160.

Cannon, S. C. (2015). Channelopathies of skeletal muscle excitability. *Comprehensive Physiology*, 5(2), 761.

Cannon, S. C. (2017). Sodium channelopathies of skeletal muscle. *Voltage-gated sodium channels: structure, function and channelopathies*, 309-330..

Catterall, W. A. (1984). "The molecular basis of neuronal excitability." *Science* 223(4637): 653-661.

Catterall, W. A. (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 26(1), 13-25.

Catterall, W. A. (2014). Structure and function of voltage-gated sodium channels at atomic resolution. *Experimental physiology*, 99(1), 35-51

Catterall, W. A., Goldin, A. L., & Waxman, S. G. (2005). International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacological reviews*, 57(4), 397-409.

Cummins TR, Sigworth FJ (1996) Impaired slow inactivation in mutant sodium channels. *Biophys J* 71:227–236

De Lera Ruiz, M., & Kraus, R. L. (2015). Voltage-gated sodium channels: structure, function, pharmacology, and clinical indications. *Journal of medicinal chemistry*, 58(18), 7093-7118.

Devane, W. A., Dysarz, F. A., Johnson, M. R., Melvin, L. S., & Howlett, A. C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular Pharmacology*.

Devinsky, O., Cross, J. H., Laux, L., Marsh, E., Miller, I., Nabbout, R., & Wright, S. (2017). Trial of cannabidiol for drug-resistant seizures in the Dravet syndrome. *New England Journal of Medicine*, 376(21), 2011-2020.

Di Marzo V, De Petrocellis L, Bisogno T (2005). The biosynthesis, fate and pharmacological properties of endocannabinoids. *Handb Exp Pharmacol* 168: 147–185

Duan Y, Zheng J, Nicholson RA (2008). Inhibition of [3H] batrachotoxinin A-20 $\alpha$ -benzoate binding to sodium channels and sodium channel function by endocannabinoids. *Neurochem Int* 52: 438–446.

Dyson A, Peacock M, Chen A, Courade JP, Yaqoob M, Groarke A, (2005) Brain C, Loong Y, Fox A. Antihyperalgesic properties of the cannabinoid CT-3 in chronic neuropathic and inflammatory pain states in the rat. *Pain* 2005; 116:129–37

Foadi, N., Berger, C., Pilawski, I., Stoetzer, C., Karst, M., Haeseler, G., & Ahrens, J. (2014). Inhibition of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels by the synthetic cannabinoid ajulemic acid. *Anesthesia & Analgesia*, 118(6), 1238-1245.

Ghovanloo, M. R., Choudhury, K., Bandaru, T. S., Fouda, M. A., Rayani, K., Rusinova, R., & Ruben, P. C. (2021). Cannabidiol inhibits the skeletal muscle Nav1.4 by blocking its pore and by altering membrane elasticity. *Journal of General Physiology*, 153(5), e202012701.

Ghovanloo, M. R., Shuart, N. G., Mezeyova, J., Dean, R. A., Ruben, P. C., & Goodchild, S. J. (2018). Inhibitory effects of cannabidiol on voltage-dependent sodium currents. *Journal of Biological Chemistry*, 293(43), 16546-16558.

Goldin, A. L., Barchi, R. L., Caldwell, J. H., Hofmann, F., Howe, J. R., Hunter, J. C., & Catterall, W. A. (2000). Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 28(2), 365-368.

Guy, H. R., & Seetharamulu, P. (1986). Molecular model of the action potential sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(2), 508-512.

Hille, B. (2001). *Ion channels of excitable membranes* (Sinauer, Sunderland, MA).

Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. (1952). The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *The Journal of physiology*, 116(4), 473-496.

Karp, G. (2014). *Biologia celular y molecular: conceptos y experimentos (7a)*. McGraw Hill Mexico.

Lai, H. C., & Jan, L. Y. (2006). The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(7), 548-562.

Marban, E., Yamagishi, T., & Tomaselli, G. F. (1998). Structure and function of voltage-gated sodium channels. *The Journal of physiology*, 508(3), 647-657.

Morales, P., Hurst, D. P., & Reggio, P. H. (2017). Molecular targets of the phytocannabinoids: a complex picture. *Phytocannabinoids*, 103-131.

Nicholson, R. A., Liao, C., Zheng, J., David, L. S., Coyne, L., Errington, A. C., ... & Lees, G. (2003). Sodium channel inhibition by anandamide and synthetic cannabimimetics in brain. *Brain research*, 978(1-2), 194-204.

Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., ... & Numa, S. (1984). Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature*, 312(5990), 121-127.

O'Leary, M. E., & Chahine, M. (2017). Mechanisms of drug binding to voltage-gated sodium channels. *Voltage-gated Sodium Channels: Structure, Function and Channelopathies*, 209-231.

Okada, Y., Imendra, K. G., Miyazaki, T., Hotokezaka, H., Fujiyama, R., Zeredo, J. L., ... & Toda, K. (2005). Biophysical properties of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels in frog parathyroid cells and their modulation by cannabinoids. *Journal of experimental biology*, 208(24), 4747-4756.

Okura, D., Horishita, T., Ueno, S., Yanagihara, N., Sudo, Y., Uezono, Y., & Sata, T. (2014). The endocannabinoid anandamide inhibits voltage-gated sodium channels Nav1. 2, Nav1. 6, Nav1. 7, and Nav1. 8 in *Xenopus oocytes*. *Anesthesia & Analgesia*, 118(3), 554-562.

Paiz-Candia, B., Islas, A. A., Sánchez-Solano, A., Mancilla-Simbro, C., Scior, T., Millan-PerezPeña, L., & Salinas-Stefanon, E. M. (2017). Mefloquine inhibits voltage dependent Nav1. 4 channel by overlapping the local anaesthetic binding site. *European journal of pharmacology*, 796, 215-223.

Pan, X., Li, Z., Zhou, Q., Shen, H., Wu, K., Huang, X., & Yan, N. (2018). Structure of the human voltage-gated sodium channel Nav1. 4 in complex with  $\beta 1$ . *Science*, 362(6412).

Patel, R. R., Barbosa, C., Brustovetsky, T., Brustovetsky, N., & Cummins, T. R. (2016). Aberrant epilepsy-associated mutant Nav1. 6 sodium channel activity can be targeted with cannabidiol. *Brain*, 139(8), 2164-2181.

Rojas CV, Wang JZ, Schwartz LS, Hoffman EP, Powell BR, Brown RH Jr (1991) A Met-to-Val mutation in the skeletal muscle Na<sup>+</sup> channel alpha-subunit in hyperkalaemic periodic paralysis. *Nature* 354:387–389

Rosas, M. M. (2004). Los canales iónicos: la biología y patología. *Archivos de cardiología de México*, 74(s2), 205-210.

Russo EB. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *Br J Pharmacol*. 2011; 163(7):1344-64

Salceda, E., & Ortega, A. (2009). Neurotoxinas: significado biológico y mecanismos de acción.

Salinas-Stefanon, E. M., Martínez-Morales, E., Scior, T. F., & Millan-PerezPeña, L. (2011). A residue W756 in the P-loop segment of the sodium channel is critical for primaquine binding. *European journal of pharmacology*, 663(1-3), 1-8.

Sánchez-Solano, A., Islas, A. A., Scior, T., Paiz-Candia, B., Millan-PerezPeña, L., & Salinas-Stefanon, E. M. (2017). Characterization of specific allosteric effects of the Na<sup>+</sup> channel  $\beta 1$  subunit on the Nav 1.4 isoform. *European Biophysics Journal*, 46(5), 485-494.

Schlieff, T., Schönherr, R., Imoto, K., & Heinemann, S. H. (1996). Pore properties of rat brain II sodium channels mutated in the selectivity filter domain. *European biophysics journal*, 25(2), 75-91.

Singer, S. J., & Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(4023), 720-731.

Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2007). *Fundamentos de Bioquímica/Fundamental of Biochemistry*. Ed. Médica Panamericana. Biología celular.

Watkins, A. R. (2019). Cannabinoid interactions with ion channels and receptors. *Channels*, 13(1), 162-167.

Yang N, Ji S, Zhou M, Ptacek LJ, Barchi RL, Horn R & George AL Jr (1994) Sodium channel mutations in paramyotonia congenita exhibit similar biophysical phenotypes in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:12785–12789

Yarov-Yarovoy, V., Baker, D., & Catterall, W. A. (2006). Voltage sensor conformations in the open and closed states in ROSETTA structural models of K<sup>+</sup> channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(19), 7292-7297.

# ANEXOS



## Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Medicina  
Instituto de Fisiología

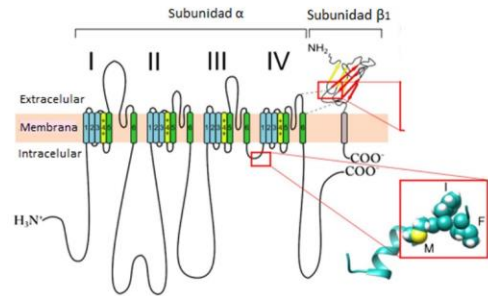
Licenciatura en Biomedicina  
Laboratorio de Biofísica Cardíaca



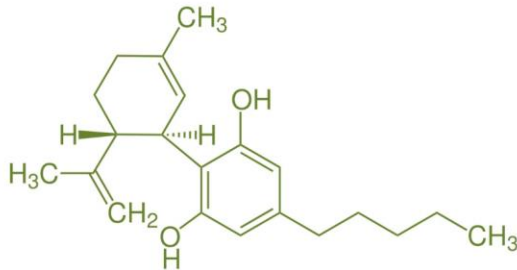
### EFFECTOS ELECTROFISIOLÓGICOS DEL CANNABIDIOL (CBD) SOBRE EL CANAL NAV 1.4

Nav 1.4 es la isoforma más abundante en el músculo esquelético, y se ha observado su expresión a niveles más bajos en el músculo esquelético neonatal.

Su función principal es controlar la excitabilidad de las fibras musculares al iniciar el potencial de acción. Mutaciones relacionadas al gen que lo codifica, SCN4A, han sido ligadas a trastornos neuromusculares.



#### CBD SOBRE CORRIENTES DE SODIO



Cannabis sativa, una planta conocida más comúnmente como marihuana, contiene compuestos relacionados conocidos como fitocannabinoides.

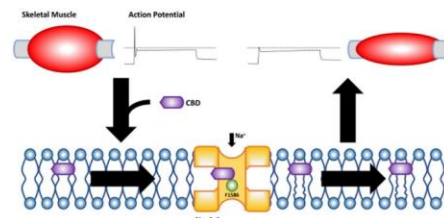
Su principal compuesto no psicoactivo es el cannabidiol (CBD). Evidencia respalda que CBD modula canales iónicos dependientes de voltaje, incluidos los de sodio (Nav).

Trabajos han demostrado inhibición de la corriente de sodio sobre isoformas hNav1.1 al 1.7, exhibiendo un bloqueo en estado de reposo y ralentizando la recuperación de la inactivación, lo que respalda la idea de que la unión del CBD estabiliza preferentemente los estados inactivados del canal Nav. *Ghovanloo, 2018*

#### EFFECTOS DEL CBD SOBRE CANALES NAV 1.4

La inhibición de Nav por el CBD ha mostrado tener al menos dos componentes: bloque físico del poro y efectos indirectos como la modulación de la elasticidad de la membrana.

Las corrientes de sodio se inhiben de manera dependiente de la concentración, desplazando la curva de inactivación de Na<sup>+</sup> en estado estacionario a potenciales más hiperpolarizados, por lo que es posible que el fármaco pueda modular la excitabilidad celular. *Ghovanloo, 2021*



#### CONCLUSIONES

Resultados in vitro e in silico sugieren que el CBD puede tener un valor terapéutico contra la hiperexcitabilidad de Nav1.4 contribuyendo a la reducción de las contracciones del músculo esquelético, generando un importante valor contra canalopatías relacionadas a la isoforma.

Sin embargo es necesario realizar más estudios para caracterizar mejor las propiedades farmacocinéticas de la molécula.

