

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla



Instituto de Fisiología

Laboratorio de Biofísica Cardíaca



Efectos de JNJ777120 sobre los canales de sodio $rNa_v1.4$ expresados en ovocitos de la rana *Xenopus laevis*

TESIS

Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Fisiológicas

Presenta:

L.B.M. Víctor Juárez Quintero

Tutor:

D.C. Eduardo M. Salinas Stefanón

Puebla, Pue., 30 de junio de 2017

A mi madre, familiares y amigos.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Biofísica Cardíaca en el Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

El financiamiento para la realización del presente trabajo fue aportado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a través de la beca con número: 664891.

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

Índice

| | |
|--|------------|
| ÍNDICE | I |
| ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS | III |
| ABREVIATURAS | IV |
| RESUMEN | V |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| <i>Propiedades químicas de JNJ777120</i> | <i>1</i> |
| <i>Mecanismo de acción</i> | <i>1</i> |
| ANESTÉSICOS LOCALES | 3 |
| <i>Propiedades químicas y relación estructura-actividad</i> | <i>3</i> |
| <i>Mecanismo de acción de los anestésicos locales</i> | <i>4</i> |
| <i>Dependencia de la frecuencia de los anestésicos locales</i> | <i>6</i> |
| <i>Efecto del pH</i> | <i>6</i> |
| RELACIÓN ENTRE JNJ777120 Y ANESTÉSICOS LOCALES | 7 |
| CANAL DE SODIO VOLTAJE DEPENDIENTE | 9 |
| <i>Estructura y función del canal de sodio voltaje dependiente</i> | <i>10</i> |
| <i>Cinética del canal de sodio voltaje dependiente</i> | <i>13</i> |
| <i>Corriente de sodio (I_{Na})</i> | <i>14</i> |
| <i>Canal de sodio $Na_v1.4$</i> | <i>15</i> |
| <i>Farmacología del canal de sodio voltaje dependiente</i> | <i>15</i> |
| JUSTIFICACIÓN | 16 |
| HIPÓTESIS | 17 |
| OBJETIVOS | 17 |
| OBJETIVO GENERAL | 17 |
| OBJETIVOS PARTICULARES | 17 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 18 |
| FÁRMACOS..... | 18 |
| MODELO..... | 18 |
| SOLUCIONES | 18 |
| METODOLOGÍA PARA OBTENCIÓN DE OVOCITOS..... | 18 |
| <i>Anestesia</i> | <i>18</i> |
| <i>Cirugía</i> | <i>19</i> |
| <i>Proceso enzimático</i> | <i>19</i> |
| <i>Selección de ovocitos</i> | <i>19</i> |
| METODOLOGÍA PARA EXPRESIÓN DE CANALES DE SODIO | 19 |
| <i>Inyección de ovocitos</i> | <i>19</i> |
| METODOLOGÍA PARA EL REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO | 20 |
| <i>Criterios de inclusión y exclusión</i> | <i>20</i> |
| <i>Aplicación de JNJ777120</i> | <i>20</i> |
| PROTOCOLOS EXPERIMENTALES | 20 |
| <i>Protocolo I. Relación corriente contra voltaje</i> | <i>21</i> |
| <i>Protocolo II. Inactivación de estado estable</i> | <i>21</i> |

| | |
|---|-----------|
| <i>Protocolo III. Conductancia del canal de sodio voltaje dependiente</i> | 22 |
| <i>Protocolo IV. Recuperación de la inactivación</i> | 22 |
| <i>Protocolo V. Dependencia de uso y frecuencia</i> | 23 |
| <i>Protocolo VI. Curso temporal</i> | 23 |
| <i>Protocolo VII. Competencia de fármacos</i> | 23 |
| <i>Análisis estadístico</i> | 24 |
| <i>Bioética</i> | 24 |
| RESULTADOS | 25 |
| BLOQUEO DEPENDIENTE DE LA CONCENTRACIÓN | 25 |
| RELACIÓN CORRIENTE CONTRA VOLTAJE..... | 26 |
| INACTIVACIÓN DE ESTADO ESTABLE Y CONDUCTANCIA | 27 |
| CINÉTICA DE INACTIVACIÓN..... | 28 |
| CURSO TEMPORAL DE LA RECUPERACIÓN DE LA INACTIVACIÓN | 29 |
| BLOQUEO DEPENDIENTE DE USO Y FRECUENCIA..... | 30 |
| CURSO TEMPORAL | 31 |
| DETERMINACIÓN DEL SITIO DE UNIÓN A JNJ777120..... | 31 |
| RELACIÓN CORRIENTE CONTRA VOLTAJE EN F1579A + b1 | 32 |
| INACTIVACIÓN DE ESTADO ESTABLE Y CONDUCTANCIA EN F1579A + b1 | 33 |
| CINÉTICA DE INACTIVACIÓN..... | 34 |
| CURSO TEMPORAL DE LA RECUPERACIÓN DE LA INACTIVACIÓN | 35 |
| BLOQUEO DEPENDIENTE DE USO Y FRECUENCIA..... | 36 |
| COMPETENCIA DE FÁRMACOS..... | 37 |
| SIMULACIONES DE DOCKING MOLECULAR | 38 |
| DISCUSIÓN | 40 |
| CONCLUSIONES | 45 |
| BIBLIOGRAFÍA | 46 |

Índice de figuras y tablas

Índice de figuras

| | |
|-----------------|----|
| FIGURA 1 | 1 |
| FIGURA 2 | 4 |
| FIGURA 3 | 8 |
| FIGURA 4 | 8 |
| FIGURA 5 | 9 |
| FIGURA 6 | 11 |
| FIGURA 7 | 14 |
| FIGURA 8 | 24 |
| FIGURA 9 | 25 |
| FIGURA 10 | 26 |
| FIGURA 11 | 27 |
| FIGURA 12 | 28 |
| FIGURA 13 | 29 |
| FIGURA 14 | 30 |
| FIGURA 15 | 31 |
| FIGURA 16 | 32 |
| FIGURA 17 | 33 |
| FIGURA 18 | 34 |
| FIGURA 19 | 35 |
| FIGURA 20 | 36 |
| FIGURA 21 | 37 |
| FIGURA 22 | 38 |
| FIGURA 23 | 39 |

Índice de tablas

| | |
|---------------|----|
| TABLA 1 | 10 |
| TABLA 2 | 28 |
| TABLA 3 | 29 |
| TABLA 4 | 33 |
| TABLA 5 | 35 |
| TABLA 6 | 37 |

Abreviaturas

| | |
|-----------------------|---|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ADNc | Ácido desoxirribonucleico complementario |
| Ala/A | Alanina |
| Asp/D | Asparagina |
| CHO | Células de ovario de hámster chino |
| DEKA | Aminoácidos que forman el filtro de selectividad (asparagina, glutamato, lisina, alanina) |
| DI | Dominio 1 |
| DII | Dominio 2 |
| DIII | Dominio 3 |
| DIV | Dominio 4 |
| EC ₅₀ | Concentración efectiva al 50% |
| E _m | Potencial de membrana |
| E _{Na} | Potencial de equilibrio de Sodio |
| Glu/E | Glutamato |
| <i>g_{Na}</i> | Conductancia de membrana al ion sodio |
| H ₄ | Receptor a Histamina 4 |
| IC ₅₀ | Concentración inhibitoria al 50% |
| I _{Na} | Corriente de sodio |
| I _{NaP} | Corriente persistente de sodio |
| I _{NaT} | Corriente transitoria de sodio |
| JNJ7777120/JNJ | 1-[(5-cloro-1H-indol-2-carbonil]-4-metilpiperazina |
| Lys/K | Lisina |
| Na _v | Canal de sodio voltaje dependiente |
| Na _v Av | Canal de sodio voltaje-dependiente de <i>Arcobacter butzleri</i> |
| QX-314 | Lidocaína de cuarta generación |
| S1 | Segmento 1 |
| S2 | Segmento 2 |
| S3 | Segmento 3 |
| S4 | Segmento 4 |
| S5 | Segmento 5 |
| S6 | Segmento 6 |
| SNC | Sistema nervioso central |
| SNP | Sistema nervioso periférico |
| STX | Saxitoxina |
| TRP | Canales receptores de potenciales transitorios |
| TRPV1 | Canales receptores de potenciales transitorios vaniloide tipo 1 |
| TTX | Tetrodotoxina |
| α | Subunidad alfa |
| β | Subunidad beta |
| τ | Constante de tiempo |

Resumen

El fármaco JNJ7777120 es un antihistamínico específico para el receptor de histamina H₄. Debido a su potente efecto antiinflamatorio, se ha propuesto el uso de este fármaco para el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Datos no publicados por Seseña y colaboradores muestran que JNJ7777120 ejerce un efecto inhibitorio en la descarga de neuronas aferentes vestibulares por una interacción directa con los canales de sodio voltaje dependiente. Se ha reportado en experimentos *in vivo* que, aunado al efecto antiinflamatorio, JNJ7777120 posee un efecto antihiperalgésico y antinociceptivo (Coruzzi, 2007) y posiblemente produzca un déficit motor (Hsieh, 2010), que hasta el momento no ha podido ser explicado y atribuido solo al bloqueo del receptor de histamina H₄. Este efecto podría ser explicado por un bloqueo de los canales de sodio dependientes de voltaje.

En este trabajo experimental se estudió el efecto de JNJ7777120 en el canal rNa_v1.4 y la mutante de sitio de unión a anestésicos locales (F1579A), expresados en ovocitos de *Xenopus laevis* mediante el registro electrofisiológico con la técnica de fijación de voltaje de doble microelectrodo. Se concluye que JNJ7777120 bloquea al canal de sodio a través de una interacción con el sitio de unión a anestésicos locales y muestra un comportamiento diferente al de los anestésicos locales.

Introducción

JNJ7777120 es un fármaco descrito como el primer antagonista selectivo para el receptor de histamina H₄ (Thurmond, 2003; Thurmond, 2004). Fue desarrollado en 2003 por Jablonowski debido a que no existía una herramienta farmacológica que permitiera estudiar al receptor de histamina H₄, que hasta entonces permanecía desconocida la función y los procesos en los que estaba involucrado dicho receptor (Jablonowski, 2003; Thurmond, 2003; Thurmond, 2004). JNJ7777120 resultó ser un potente antiinflamatorio por su efectividad y debido a la baja dosis (EC₅₀ 7 nM) (Thurmond, 2004) se propuso su uso para tratar distintas enfermedades inflamatorias e incluso ha demostrado ser superior a los antihistamínicos tradicionales (Dunford, 2007).

Propiedades químicas de JNJ7777120

El nombre químico de JNJ7777120 es 1-[(5-cloro-1H-indol-2-carbonil]-4-metilpiperazina y es una indol-amida: está conformado por un grupo indol y un grupo piperazina unidos por una cadena (Figura 1). El grupo indol está formado por un benceno y un anillo pirrol y le aporta una fracción hidrófoba mientras que el grupo piperazina es un anillo hexagonal que contiene 2 átomos de nitrógeno en posiciones opuestas en el anillo y le proporciona una fracción hidrofílica. JNJ7777120 tiene un coeficiente de liposolubilidad (Log S) de -3.421, pKa de 6.83. A pH de 7.6 el 85.38% se encuentra en su forma terciaria, es decir, no protonada y el 14.62% en su forma cuaternaria o protonada (Chemicalize.com, 2017).

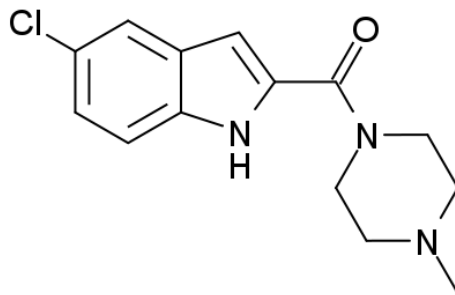


Figura 1. Estructura química de JNJ7777120.

Mecanismo de acción

JNJ7777120 posee una alta selectividad por el receptor H₄, la cual es mil veces mayor que la que tiene por los receptores H₁, H₂ y H₃. El receptor H₄ es expresado en las células con linaje

hematopoyético (Oda & Morikawa, 2000; Liu & Ma, 2001); específicamente se ha observado en eosinófilos, células T, células dendríticas, basófilos y principalmente mastocitos (Liu & Ma, 2001; O'Reilly *et al.*, 2012). Existen reportes de que existe expresión del receptor H₄ en el sistema nervioso central (SNC) y en células dorsales de la raíz del ganglio (DRG) (Connely & Shenton, 2009; Cogé & Guénin, 2001; Liu & Ma, 2001).

El receptor de histamina H₄ al ser activado por la histamina, induce una entrada de calcio y quimiotaxis en mastocitos (Thurmond, 2004) así como la liberación de gránulos. En eosinófilos, el receptor H₄ modula cambios en el citoesqueleto, quimiotaxis y la expresión de moléculas de adhesión celular (Varga, 2005; Coruzzi, 2007). JNJ7777120 al unirse al receptor de histamina H₄ bloquea la entrada de calcio inducida y la quimiotaxis; adicionalmente puede bloquear la migración de mastocitos y bloquear la infiltración de neutrófilos en modelos de peritonitis inducida por zimosan (Thurmond, 2003; Thurmond, 2004). JNJ7777120 posee un potente efecto antiinflamatorio y se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* su eficacia (Coruzzi, 2007; Hsieh, 2010; Thurmond, 2004), por lo que se ha propuesto el uso de JNJ7777120 para tratar enfermedades donde existe un incremento de mastocitos y la presencia del receptor H₄ tales como asma, rinitis, artritis reumatoide, psoriasis y algunas enfermedades cardiovasculares, entre otras (Hsieh, 2010; Thurmond, 2004; Varga, 2005).

JNJ7777120 es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica (Dunford, 2007; Hsieh, 2010) y se ha observado que tiene una mayor afinidad hacia el SNC, posiblemente por una unión inespecífica en tejidos del SNC (Hsieh, 2010).

En 2007, Coruzzi *et al.* reportaron que JNJ7777120 atenúa significativamente la respuesta hiperalgésica a estímulos térmicos (respuesta mediada por mastocitos) (Coruzzi, 2007); y hasta el momento, se desconoce el mecanismo por el que se produce la antinocicepción mediada por JNJ7777120 y se sugiere que puede ser atribuida al efecto antiinflamatorio por el bloqueo del receptor a histamina H₄ (Coruzzi, 2007; Hsieh, 2010). Hsieh *et al.* realizaron estudios para demostrar que el aumento de la latencia y el umbral al dolor en ratas frente a estímulos térmicos por la administración de JNJ7777120 no se debía a un mal funcionamiento motor; sus resultados

no son concluyentes y argumentan que JNJ7777120 si podría producir déficits motores (Hsieh, 2010).

En datos no publicados por Seseña *et al.* descubrieron que JNJ7777120 inhibe la descarga de potenciales de acción en neuronas aferentes vestibulares. Este efecto no era posible de explicar mediante el bloqueo del receptor de histamina H_4 debido a que al utilizar GDP- β -S, un inhibidor de proteínas G y la pipeta de registro con solución cero GTP, el efecto inhibitorio de JNJ7777120 se mantenía. Por lo que, decidieron estudiar las corrientes transientes (I_{NaT}) y persistentes (I_{NaP}) de sodio (que intervienen en la generación del potencial de acción). Observaron que JNJ7777120 inhibe a I_{NaT} e I_{NaP} con un mecanismo independiente de proteínas G, además observaron que el uso de VUF8430, un agonista específico para el receptor de histamina H_4 no modificaba de manera significativa las corrientes de sodio. Estos resultados sugirieron que JNJ7777120 podría interactuar con los canales de sodio voltaje dependiente. El déficit motor y la antinocicepción mediados por JNJ7777120 podrían ser explicados a través del bloqueo de canales de sodio voltaje dependientes al actuar como un anestésico local.

Anestésicos locales

Los anestésicos locales son un grupo de fármacos que causan de manera reversible la ausencia de dolor. Los anestésicos locales bloquean al canal de sodio voltaje dependiente e impiden la despolarización de las células provocando que no se lleve a cabo el potencial de acción (Catterall & Mackie, 2012; Strichartz & Ritchie, 1987). Dependiendo de la localización de su administración, los anestésicos locales pueden bloquear vías nerviosas específicas o provocar parálisis debido a la pérdida de potencia muscular. Estos fármacos pueden unirse a otras proteínas de membrana (Butterworth & Strichartz, 1990). En particular, pueden bloquear los canales de potasio, pero para ello es necesario mayores concentraciones de fármaco (Strichartz & Ritchie, 1987).

Propiedades químicas y relación estructura-actividad

Los anestésicos locales están conformados por una fracción hidrófila y una hidrófoba que se encuentran separadas por una ligadura de éster o amida intermedia (Figura 2). El grupo hidrófilo es una amina terciaria o secundaria mientras que la porción hidrófoba debe ser aromática. El grupo de enlace que une las dos fracciones determina algunas de las propiedades farmacológicas

de los anestésicos locales, por ejemplo, si poseen un grupo amida son metabolizados en el hígado (Becker, 2006). La fracción hidrófoba incrementa la potencia, así como la duración de la acción de los anestésicos locales (Becker, 2006; Catterall & Mackie, 2012; Courtney & Strichartz, 1987; Scholz, 2002). El tamaño molecular influye en la velocidad de disociación; las moléculas más pequeñas del fármaco pueden escapar del sitio receptor con mayor rapidez (Catteral & Mackie, 2012; Kaczmariski & Corry, 2014; Smith & Corry, 2016).

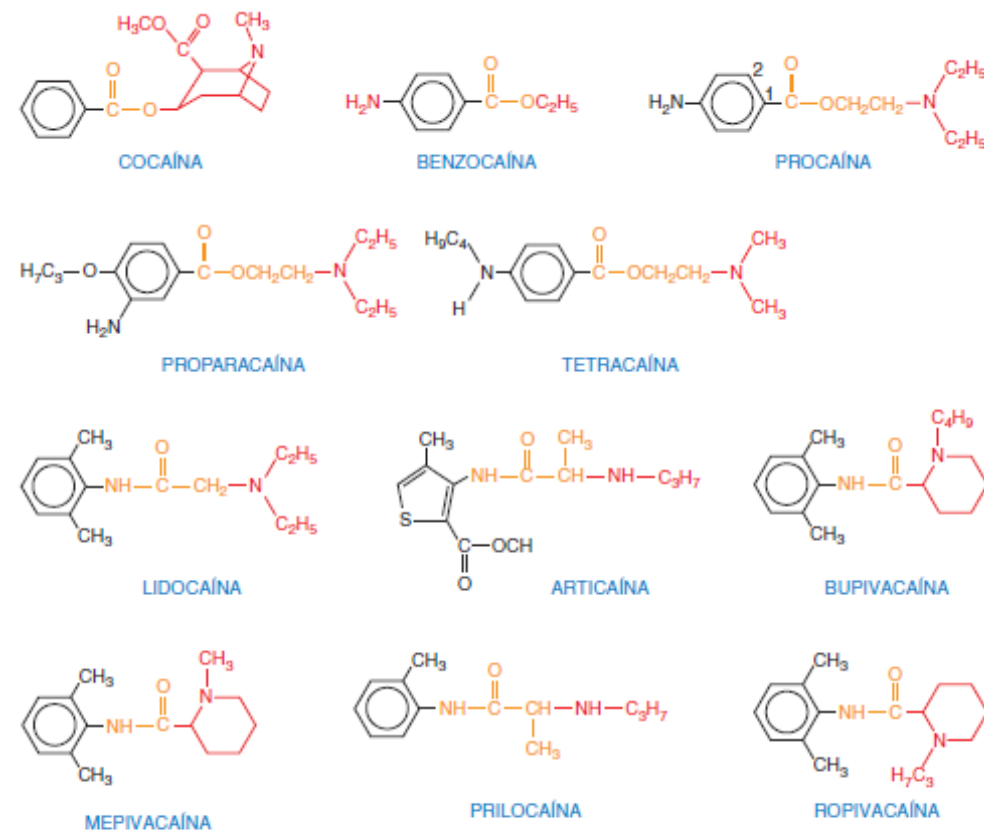


Figura 2. Fórmulas estructurales de algunos anestésicos locales utilizados clínica y experimentalmente. Los anestésicos locales están conformados por tres estructuras importantes; el grupo amino y un anillo aromático que se encuentra unido al grupo amino por medio de una cadena intermedia. Figura tomada de Catterall & Mackie, 2012.

Mecanismo de acción de los anestésicos locales

Todos los anestésicos locales provocan un bloqueo tónico y fásico. El bloqueo tónico ocurre sobre corrientes obtenidas a partir de despolarizaciones a bajas frecuencias, por lo que la mayoría de canales se encuentran en el estado de reposo. El bloqueo fásico (denominado "dependiente de frecuencia"), ocurre sobre corrientes obtenidas mediante despolarizaciones cortas (1-5 ms) a

altas frecuencias, en donde el lapso de tiempo entre pulsos no es suficiente para la recuperación de los canales, por lo que una gran proporción de canales se encuentran en estado inactivado y el canal “acumula inactivación” (*rundown*) (Golan *et al.*, 2008; Olschewski *et al.*, 1998).

Fozzard, en 2011 menciona que los anestésicos locales a nivel electrofisiológico poseen tres características principales (Fozzard, 2011; Tikhonov, 2017). La primera característica es la baja afinidad del anestésico local por el estado en reposo del canal de sodio (bloqueo tónico), lo que requiere el uso de concentraciones en el rango milimolar. En la segunda característica, el anestésico local genera un bloqueo instantáneo del canal a través del filtro de selectividad, para observar esta característica es necesario abrir el canal con batracotoxina (Strichartz, 1990). La tercera característica es un bloqueo de alta afinidad de los anestésicos locales por los estados abierto e inactivado del canal, el cual es dependiente de voltaje (Fozzard, 2011; Sheets *et al.*, 2010; Tikhonov, 2017).

El bloqueo de alta afinidad es explicado por la “hipótesis del receptor modulado” propuesto inicialmente por Hille (Wang & Strichartz, 2012; Hille, 1977; Hille, 2001). Esta hipótesis propone que la alta afinidad de los anestésicos locales depende de la modificación conformacional del canal de sodio que ocurre durante la transición del estado cerrado al abierto y de éste al inactivado exponiendo el sitio de unión a los anestésicos locales. Esto implica un mecanismo de unión ligando-receptor de tipo “ajuste inducido” (*induced-fit*), provocado por la despolarización de la membrana. Además, esta hipótesis implica que, los anestésicos locales estabilizan el estado inactivado, “atrapando” al canal en dicho estado durante pulsos repetitivos (Butterworth & Strichartz, 1990; Catterall & Mackie, 2012; Courtney & Strichartz, 1987; Wang *et al.*, 2012).

Se ha observado que el segmento S6 (particularmente de los dominios DI, DIII y DIV) de los canales de sodio son cruciales para la apertura y la inactivación rápida y lenta del canal (Fozzard, 2011; Wang & Strichartz, 2012; Hille, 1977; Hille, 2001). La fenilalanina en la posición 1762 (S6DIV) en Na_v1.2 (F1579 en Na_v1.4) es fundamental para la inactivación rápida del canal (McPhee *et al.*, 1995; Wang & Strichartz, 2012) y es el principal aminoácido en el sitio de unión a anestésicos locales. El grupo de Catterall realizó mutaciones puntuales en el segmento S6 de cada aminoácido por alanina y observaron que al mutar la fenilalanina el bloqueo por anestésicos locales se perdía,

también mostró que una tirosina es importante para la unión del fármaco al sitio (Fozzard, 2011; McPhee *et al.*, 1995; Wang & Strichartz, 2012; Ragsdale & McPhee, 1994; Yarov-Yarovoy & McPhee, 2002).

Dependencia de la frecuencia de los anestésicos locales

Las propiedades de los anestésicos locales están en función de su pKa, liposolubilidad, y su tamaño molecular. En general, la dependencia de la frecuencia está determinada fundamentalmente por la velocidad de disociación de su sitio de unión. La disociación de los fármacos más pequeños y más hidrófobos es más rápida, de modo que se requiere una alta frecuencia de estimulación para producir un bloqueo dependiente de la frecuencia (Catterall & Makie, 2012).

Efecto del pH

Los anestésicos locales, por ser aminas sin carga eléctrica (no protonadas), tienden a ser sólo ligeramente solubles en agua por lo que son presentadas como sal hidrocloreuro para hacerlas solubles en agua. Debido a que los anestésicos locales son bases débiles ($pK_a > 7.4$ siendo los valores característicos entre 8 y 9), sus clorhidratos son levemente ácidos (Becker, 2006; Catterall & Mackie, 2012). Esta propiedad incrementa la estabilidad de los anestésicos locales tipo éster y de las catecolaminas que se agregan como vasoconstrictores. A un pH igual al pKa de la base protonada, las formas ionizadas y no ionizadas de los anestésicos se encontrarán en cantidades equimolares. La base no protonada difunde fácilmente a través de la membrana celular mientras que la forma protonada no. Aunque se requieren especies no protonadas de anestésicos locales para su difusión a través de las membranas celulares, las especies catiónicas o protonadas interactúan de manera preferencial con los canales de sodio voltaje dependiente en el sitio de unión a anestésicos locales (Catterall & Mackie, 2012; Ritchie, 1966; Tikhonov, 2017). En experimentos sobre fibras amielínicas de mamífero anestesiado, la conducción se bloquea o desbloquea ajustando el pH del medio extracelular a 7.2 o 9.6, respectivamente, sin alterar la cantidad de anestésico presente; esto se debe a que, al cambiar el pH, aumenta o disminuye la proporción de moléculas ionizadas y, por tanto, pueden cruzar o no la membrana celular (Ritchie, 1966). Narahashi y Frazier hallaron también con claridad la función primaria de la forma catiónica perfundiendo la superficie extracelular y axoplásmica del axón del calamar gigante con

anestésicos locales de aminas terciarias y cuaternarias y encontraron que las aminas cuaternarias eran activas (Catterall & Mackie, 2012; Narahashi & Frazier, 1971). Sin embargo, las formas moleculares no protonadas poseen cierta actividad anestésica (Butterworth & Strichartz, 1990; Catterall & Mackie, 2012). Las publicaciones más recientes indican que los anestésicos locales cuaternarios como QX-314 llegan hasta la superficie citoplasmática de la membrana neuronal a través de canales receptores de potenciales transitorios subtipo vaniloide 1 (TRPV1) (Butterworth & Oxford, 2009). Los canales TRPV, y quizá otros canales iónicos, al parecer pierden su selectividad y permiten el paso de moléculas similares a QX-314 en el contexto de una activación prolongada o intensa.

Relación entre JNJ7777120 y anestésicos locales

La estructura química de JNJ7777120 es similar a la estructura química de los anestésicos locales, ya que está conformado por una sección aromática que se encuentra unido al grupo amino por una cadena intermedia. En la terapéutica, los anestésicos locales en individuos que muestran una hipersensibilidad pueden ser sustituidos por antihistamínicos (Murdoch & Greene, 1981; Smith & Peterson, 1999; Yon *et al.*, 2000) tal es el caso del uso de la difenhidramina para pacientes alérgicos a la lidocaína (Smith & Peterson, 1999; Yon *et al.*, 2000).

A un pH de 7.6 es posible encontrar a JNJ7777120 en dos diferentes estados conformacionales. Idealmente, los anestésicos locales tienen un valor de pKa similar al pH fisiológico y de esta forma encontrarse en proporción similar la cantidad de fármaco ionizado y no ionizado (Catterall & Makie, 2006). Esto no se cumple con JNJ7777120, el 85.38% está en su forma no protonada. En el restante 14.62%, el nitrógeno de la posición 2 de la metilpiperazina se encuentra en estado cuaternario, es decir, en su estado ionizado (Figura 3 y Figura 4) (Chemicalize.com, 2017).

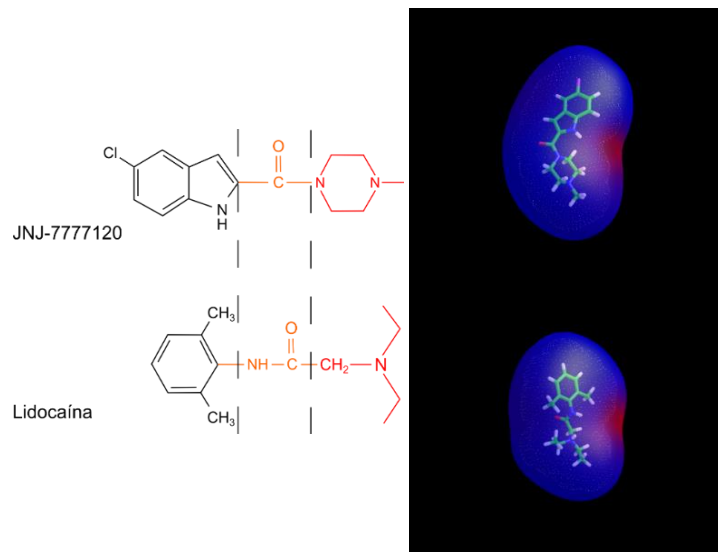


Figura 3. Comparación de la estructura química y mapa electrostático de JNJ777120 y del anestésico local lidocaína.

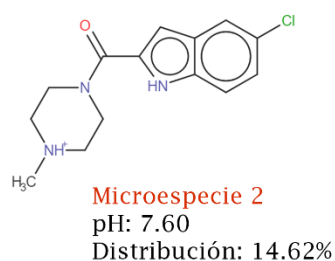
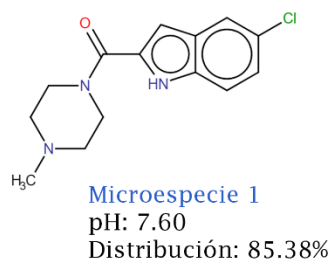
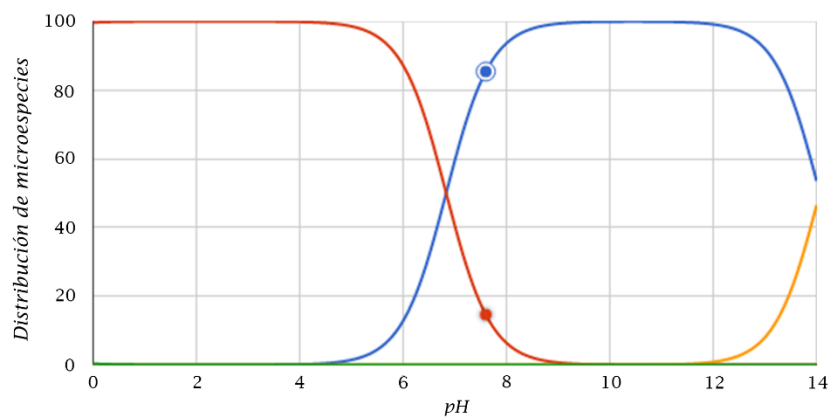


Figura 4. Distribución de microespecies vs pH de JNJ777120. Se muestran las dos microespecies que existen de JNJ777120 a pH de 7.6 y su proporción. Imagen adaptada de Chemicalize.com, 2017.

Canal de sodio voltaje dependiente

Los canales de sodio voltaje dependientes (Nav) son un grupo de proteínas que permiten el paso de iones sodio a través de la membrana. Como su nombre lo indica, la actividad de estos canales es modulada por los cambios de voltaje en el potencial de la membrana celular.

Los Nav comprenden una familia de nueve subfamilias de canales. La familia está compuesta por nueve genes que derivan en nueve proteínas distintas (Nav1.1 - Nav1.9) y una nueva subfamilia llamada NavX (Catterall, 2012). Las isoformas del canal de sodio voltaje dependiente de mamífero que se han identificado poseen una homología o porcentaje de identidad mayor al 50% de su secuencia de aminoácidos (Figura 5) (Catterall, 2015). Las diferentes isoformas difieren en: a) expresión ontogénica y regional y b) sus características electrofisiológicas. En la Tabla 1 se representan las nueve isoformas que son voltaje dependiente, su gen, expresión y sensibilidad a tetrodotoxina (TTX). En el sistema nervioso central (SNC) los principales canales de sodio voltaje dependientes son del Nav1.1 al Nav1.3, para el sistema nervioso periférico (SNP) del Nav1.7 al Nav1.9 mientras que el Nav1.6 se expresa tanto en el SNC y como en el SNP. En el músculo esquelético el principal canal es el Nav1.4 mientras que en el músculo cardiaco es el Nav1.5 (Catterall, 2005; Goldin, 1999). El NavX no es voltaje dependiente y se considera que actúa como sensor de sodio (Catterall, 2012). Pequeños cambios en las propiedades de isoformas específicas pueden resultar en enfermedades humanas que afectan al músculo esqueléticos y al sistema nervioso (Catterall, Goldin & Waxman, 2005; Catterall, 2012).

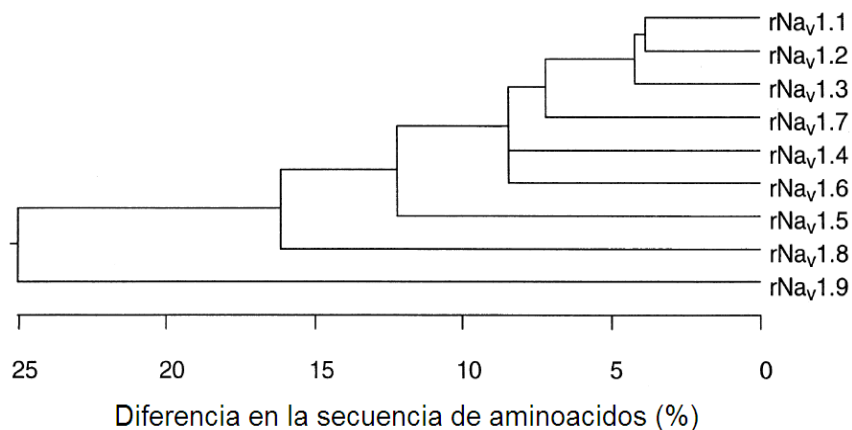


Figura 5. Diferencia en la secuencia de aminoácidos de las subunidades α de los canales de sodios voltaje dependientes de rata (rNav1.1 - rNav1.9). Figura modificada de Goldin, 2000.

Tabla 1. Familia de canales de sodio voltaje dependientes

| Subunidad α | Gen | Expresión | TTX EC ₅₀ |
|--------------------|--------|--|---------------------------|
| Nav1.1 | SCN1A | Sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP), células de la raíz del ganglio dorsal (DRG) y túbulos T en miocitos. | 6 nM |
| Nav1.2 | SCN2A | SNC, axones amielínicos y premielínicos | 12 nM |
| Nav1.3 | SCN3A | SNC, embrional y miocitos cardiacos | 4 nM |
| Nav1.4 | SCN4A | Músculo esquelético | 5 nM |
| Nav1.5 | SCN5A | Miocitos cardíacos, músculo inmaduro o denervado y algunas neuronas del SNC. | 2-6 μ M Resistente |
| Nav1.6 | SCN8A | SNC (hipocampo, células Purkinje, astrocitos), SNP, células DRG y Schwann, túbulos T en miocitos. | 1 nM |
| Nav1.7 | SCN9A | Todo tipo de neuronas DRG y simpáticas, células de Schwann y neuroendocrinas. | 4 nM |
| Nav1.8 | SCN10A | Células DRG, corazón humano y neuronas intracardiacas. | 60 mM Resist. |
| Nav1.9 | SCN11A | Neuronas tipo C en células DRG (Nocicepción) | 40 mM Resistente |

Nota. Se presenta el gen, distribución y sensibilidad a tetrodotoxina (TTX). Modificado de Savio-Galimberti, 2012.

Estructura y función del canal de sodio voltaje dependiente

Todas las subfamilias del canal de sodio voltaje dependiente comparten una estructura en común, un complejo proteico conformado por una subunidad α y subunidades β (β 1 – β 4) (Catterall, 2005; 2015; Goldin, 1999; Goldin, 2001). La subunidad α forma el poro del canal y por sí sola es funcional mientras que la subunidad β modifica las características cinéticas de la subunidad α (Egri *et al.*, 2012).

Subunidad α

La subunidad α es la subunidad principal del canal de sodio voltaje dependiente, tiene un peso de ~ 260 kDa. La secuencia de aminoácidos de esta subunidad revela una estructura común a todos los canales de sodio activados por voltaje (Figura 6). La subunidad α es una proteína heterotetrámera con cuatro dominios heterólogos (DI – DIV), cada uno de estos contienen seis segmentos transmembranales α -hélice (S1 – S6) compuestos de 19 a 27 residuos. Cada segmento está conectado con el otro por secuencias de aminoácidos no conservadas e hidrofílicas. El segmento S5 y el S6 de cada dominio da lugar a las paredes del poro y las asas que conectan ambos segmentos, llamada asa-P, forman el filtro de selectividad. El cuarto segmento (S4) de cada dominio es considerado el sensor de voltaje, ya que se encuentra cargado positivamente debido a la presencia de argininas o lisinas localizadas cada tres aminoácidos, siendo esta relación altamente conservada (Catterall, 2012). Los extremos amino y carboxilo terminal del canal están localizados de manera intracelular y las asas que conectan los interdominios se localizan en la superficie citoplasmática; las asas que conectan los dominios de DI a DII y los dominios de DII a DIII son más largas que las que conectan los dominios de DIII a DIV. El asa intracelular que conecta DIII con DIV sirve como compuerta de inactivación bloqueando al poro del canal desde el interior durante una despolarización de la membrana (Catterall, 2002).

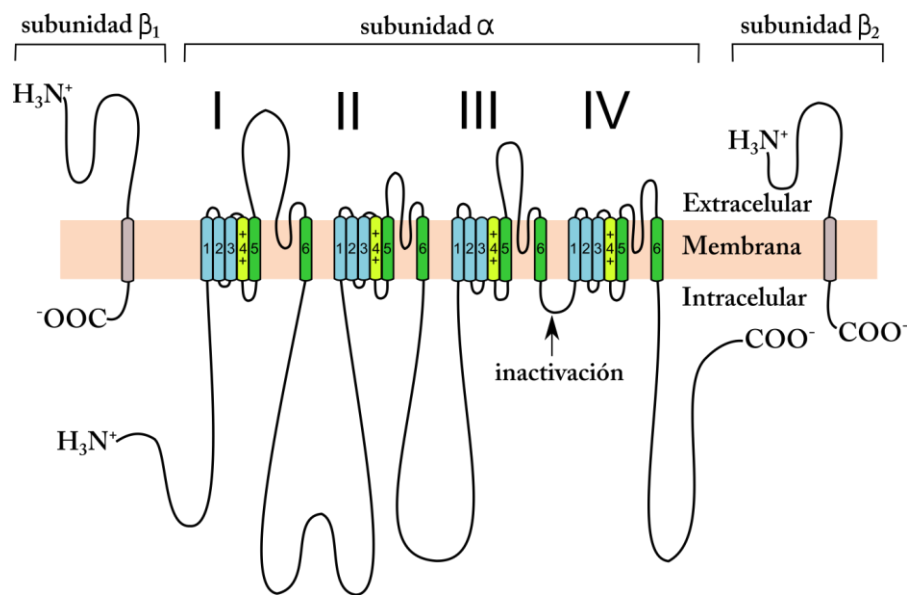


Figura 6. Representación esquemática del canal de sodio voltaje dependiente. La subunidad α es ilustrada con las subunidades β_1 y β_2 . Los segmentos S5 y S6 (en verde) conforman la pared del canal y el segmento S4 (en amarillo) es el sensor de voltaje. Figura adaptada de Catterall & Mackie, 2012.

En células procariontes, se han descrito canales de sodio voltaje dependientes (BacNa_v) que son homotetrameros y análogos en estructura a los canales de sodio de mamífero (Ren, 2001; Catterall, 2015; Alern, 2016). En 2011, Catterall y colaboradores lograron cristalizar por primera vez el canal de sodio voltaje dependiente de *Arcobacter butzleri* (Na_vAb) en una conformación de poro cerrado con una resolución de 2.7 Å (Payandeh *et al.*, 2012, O'Reilly *et al.*, 2012) lo cual ayudó a esclarecer la estructura del canal de sodio. A partir de la estructura cristalizada del canal Na_vAb , el grupo de O'Reilly generaron un modelo *in silico* por homología del canal de sodio de humano $\text{Na}_v1.5$. El canal de sodio consiste en una parte estrecha en forma de campana de 65 Å de diámetro que corresponde al 24% del volumen total, que se ensancha en forma de cuadrado hacia la parte inferior con 135 Å de altura y 100 Å de longitud a los lados (Richard, 1991; Sato *et al.*, 2001).

Filtro de selectividad

Los canales de sodio son altamente selectivos para la entrada de sodio con una razón de permeabilidad al potasio menor a 0.1 con respecto a la permeabilidad al sodio (Lipkinf & Fozzard, 2008). La selectividad por el ion Na^+ está determinada por cuatro aminoácidos bien conservados en cada dominio: I-ácido aspártico (Asp o D), II-glutamato (Glu o E), III-lisina (Lys o K) y IV-alanina (Ala o A). Estos forman un anillo interno estrecho conocido como el motivo DEKA o anillo DEKA (Lipkinf & Fozzard, 2008). A medida que el ion sodio hidratado pasa a través del filtro de selectividad, interactúa principalmente con los dos grupos de oxígeno del glutamato. Durante este proceso, los residuos del anillo DEKA forman enlaces de hidrógeno e interacciones de Van de Waals. El ion potasio no es capaz de atravesar el canal fácilmente debido a que forma una interacción débil con el glutamato y es repelido fuertemente por la lisina a diferencia del sodio que es atraído por la lisina. Si se realiza una sustitución de la lisina del anillo DEKA por glutamato (K1422E) o la alanina por glutamato (A1714E), se cambia la selectividad del canal de sodio y permite el paso de potasio y calcio (Heinemann *et al.*, 1992; Peters & Ruben, 2014).

Subunidad β

La subunidad β es la subunidad accesoria del canal de sodio voltaje dependiente, posee un peso entre 30 y 36 kDa. Forma una familia con cinco isoformas (β_1 , β_{1A} , β_2 , β_3 , β_4), que son codificadas por los genes SCN1B, SCN2B, SCN3B y SCN4B (Catterall, 2015). La organización estructural de la

subunidad β comprende un dominio amino terminal extracelular inmunoglobulínico, un segmento transmembranal y un dominio carboxilo terminal intracelular. El dominio intracelular es más corto que el extracelular. Las subunidades β modulan la actividad cinética de la subunidad α incluyendo una inactivación rápida y un cambio en la dependencia de voltaje de la inactivación de estado estable a valores negativos (Isom, 1992; Catterall, 2002). Otras funciones en las que se encuentran involucradas son la mediación de procesos de señalización que regulan la excitabilidad eléctrica de la célula, adhesión celular, migración, tránsito molecular y transcripción de la subunidad α (Brackenbury e Isom, 2011).

Modulación farmacológica de la subunidad β_1 .

La afinidad y eficacia de algunos inhibidores de los canales de sodio son alterados por los niveles de expresión de la subunidad β_1 (Uebachs *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2011). Algunos experimentos sugieren que β_1 modifica no sólo las propiedades biofísicas del canal de sodio, también modifica sus propiedades farmacológicas, en específico la respuesta a anticonvulsivos. Se ha observado que la mutación C121W en β_1 , asociada a epilepsia generalizada con episodios febriles en el gen SCN1B, reduce el bloqueo inducido por fenitoína en células que expresan el canal $\text{Na}_v1.3$ (Lucas *et al.*, 2005). Estudios en ratones knock-out de SCN1B, indican que la sensibilidad del canal de sodio a carbamazepina es dependiente de la presencia de β_1 (Uebachs *et al.*, 2010). La coexpresión de la subunidad β_1 con el canal $\text{Na}_v1.6$ modula la acción de insecticidas piretroides como teflutrina, confiriendo una mayor sensibilidad al componente dependiente de uso que este insecticida ejerce en el canal $\text{Na}_v1.6$ (Tan *et al.*, 2011).

Cinética del canal de sodio voltaje dependiente

Los canales de sodio voltaje dependientes pueden ser encontrados en tres estados principales: cerrado, abierto e inactivado (Catterall & Mackie, 2012). El estado abierto es el único estado conductor debido a que el canal permite el flujo de iones sodio mientras que el estado cerrado e inactivado, son estados no conductores. Cuando la membrana celular se encuentra en condiciones de reposo, los canales de sodio voltaje dependiente permanecen cerrados e impiden el paso de iones. Cuando se da una despolarización, los sensores de voltaje se ven afectados por el campo eléctrico de la membrana celular y comienzan a moverse a la posición activada. Una vez que los cuatro segmentos S4 se encuentran en la posición activada, los canales de sodio se abren.

La apertura del canal de sodio dura de 2 a 5 ms debido a que una vez que se abre el canal inicia el proceso de la inactivación. La inactivación consiste en la oclusión del poro intracelular producido por la partícula de inactivación. En el estado inactivado, el canal permanece abierto, pero no es conductor. La recuperación de la inactivación ocurre una vez que la membrana se repolariza y la partícula de inactivación deja de bloquear al poro (Figura 7).

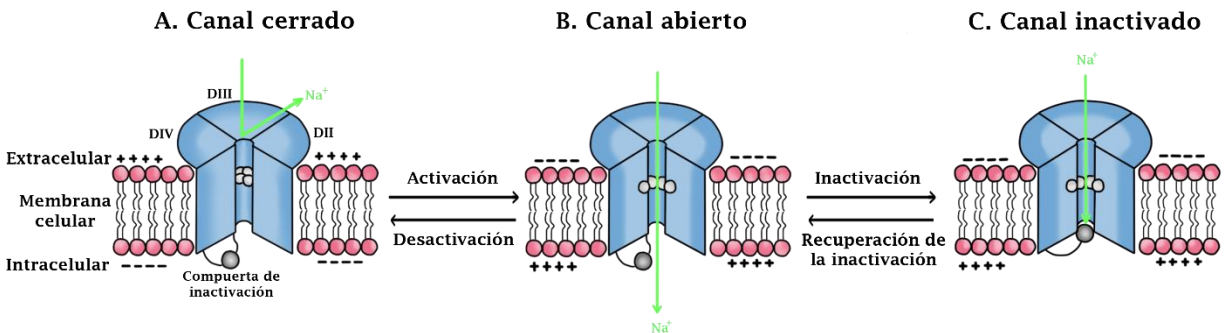


Figura 7. Estados del canal de sodio voltaje dependiente. Se muestra de manera representativa los dominios DII, DIII y DIV de la subunidad α , en gris oscuro la partícula de inactivación y en gris claro la compuerta de activación. Figura modificada y adaptada de Lehmann-Horn & Jurkatt-Rot, 1999.

Corriente de sodio (I_{Na})

Las corrientes de sodio (I_{Na}) fueron de las primeras corrientes iónicas registradas. En 1952 la corriente de sodio fue descrita por primera vez en el axón gigante de calamar por Hodgkin y Huxley. Con técnicas de fijación de voltaje encontraron y demostraron los procesos elementales del mecanismo de compuerta y la permeabilidad del canal de sodio estableciendo las tres características básicas de dicho canal:

1. Activación dependiente de voltaje
2. Inactivación rápida
3. Conductancia iónica selectiva (Hodgkin & Huxley, 1952; Catteral 2012).

En soluciones fisiológicas, la corriente de sodio generada por el canal de sodio voltaje dependiente es una corriente entrante que se activa aproximadamente a -40 mV alcanzando su pico máximo alrededor de -20 mV en menos de 1 ms e invierte la corriente a un voltaje de +50 mV. La inactivación de sodio está formada por dos componentes, uno rápido y otro lento.

Canal de sodio Na_v1.4

El Na_v1.4 es un subtipo de canal de sodio voltaje dependiente, es la isoforma principal de músculo esquelético y es expresado en niveles bajos en músculo esquelético neonatal (Barchi, 1983; Catterall, 2012). Su función fisiológica es controlar la excitabilidad de las fibras musculares al iniciar el potencial de acción. Mutaciones en este canal pueden causar parálisis periódica hipercalémica, paramiotonía congénita y miotonías agravadas por potasio (Catterall *et al.*, 2005). El Na_v1.4 es el canal de sodio voltaje dependiente más estudiado, se conoce la cinética del canal expresado en células de ovario de hámster chino (CHO) y en ovocitos de la rana *Xenopus laevis*, así como la farmacología básica de este canal (Catterall *et al.*, 2005) y sirve de control en el estudio de la cinética de una gran gama de canales de sodio voltaje dependientes.

Farmacología del canal de sodio voltaje dependiente

En la actualidad, la cinética del canal de sodio voltaje dependiente se entiende gracias a la comprensión farmacológica que se posee del canal ante diversas sustancias que han servido para estudiar las propiedades cinéticas, así como sus características estructurales. La tetrodotoxina (TTX) y la saxitoxina (STX) tienen un efecto bloqueador muy potente y específico en comparación con otros fármacos como los anestésicos locales. El uso de la TTX y la STX han permitido la determinación del filtro de selectividad, así como el vestíbulo externo del canal a través del bloqueo del anillo DEKA mediante la unión de la TTX y la STX a la boca externa del canal. La sensibilidad de las distintas isoformas de los canales de sodio voltaje dependiente por la TTX permite dividirlos y clasificarlos farmacológicamente en sensibles y resistentes a la TTX (Tabla 1). Para bloquear a los canales sensibles a la TTX se requiere de concentraciones nanomolares mientras que, en los resistentes, es necesario usar concentraciones en el orden micromolar. El canal Na_v1.4 es sensible a la TTX debido a que es necesaria una concentración de 5 nM para reducir en un 50 % la corriente (Hille, 2001, Mantengazza *et al.*, 2010; Catterall, 2005).

Justificación

El fármaco JNJ7777120 es un antihistamínico específico del receptor de histamina H₄. Debido a su potencia, este fármaco se ha propuesto para el tratamiento de enfermedades inflamatorias como el prurito, asma y enfermedades mediadas por células del sistema inmune (Dunford, 2007; Thurmond, 2004).

Seseña y colaboradores demostraron que JNJ7777120 ejerce un efecto inhibitorio en la descarga de neuronas aferentes vestibulares a través de la interacción directa con los canales de sodio voltaje dependiente. Recientemente, se ha reportado en experimentos *in vivo* que, aunado al efecto antiinflamatorio, JNJ7777120 posee un efecto antihiperálgico y antinociceptivo (Coruzzi, 2007), y posiblemente produzca un déficit motor (Hsieh, 2010). Los autores sugieren que dicho déficit no puede ser atribuido exclusivamente al bloqueo del receptor H₄ y hasta el momento no se ha explicado. Estos efectos podrían ser consecuencia del bloqueo de canales de sodio voltaje dependientes. Además, debido a la similitud estructural de JNJ7777120 con los anestésicos locales, este fármaco podría compartir su sitio de unión.

Con base a lo anterior y con el fin de esclarecer el efecto de JNJ7777120 sobre los canales de sodio, se propone estudiar la cinética del canal rNa_v1.4 y su mutante del sitio de unión a anestésicos locales (F1579A), en presencia de JNJ7777120, expresados en ovocitos de *Xenopus laevis* mediante el registro electrofisiológico con la técnica de fijación de voltaje de doble microelectrodo.

Hipótesis

JNJ7777120 modula las corrientes generadas por los canales rNa_v1.4 a través de su interacción con el sitio de unión a anestésicos locales.

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar los efectos electrofisiológicos del fármaco JNJ7777120 sobre la cinética del canal de sodio voltaje dependiente rNa_v1.4 coexpresada con la subunidad β1 en ovocitos de la rana *Xenopus laevis*.

Objetivos particulares

- Realizar una curva dosis-efecto para determinar la EC₅₀ del fármaco JNJ7777120.
- Caracterizar los efectos de JNJ7777120 en la relación corriente contra voltaje, en la curva de inactivación de estado estable y conductancia, la recuperación de la inactivación y la dependencia de uso y frecuencia del canal rNa_v1.4 + β1.
- Determinar el sitio de unión de JNJ7777120 en el canal de sodio rNa_v1.4.

Materiales y métodos

Fármacos

-JNJ7777120 (Sigma Chemical Co. S. Louis, MO).

-Lidocaína (Sigma Chemical Co. S. Louis, MO).

Modelo

La rana *Xenopus laevis* es una especie originaria de Sudáfrica, su producción de ovocitos tiene la particularidad de ser un proceso continuo y asincrónico. Los ovocitos se pueden encontrar en seis diferentes estadios numerados del I al VI (Dumont, 1972). Tienen dos hemisferios claramente delimitados, el hemisferio oscuro es conocido como polo animal, y el blanco como polo vegetal. Los ovocitos maduros (estadios V y VI) son células con un tamaño de aproximado de 1 mm de diámetro, poseen un volumen interno cercano a 1 μ l. Los ovocitos de *Xenopus laevis* se utilizan para estudios de expresión funcional debido a que su tamaño permite microinyectarlos con ARNm o ADN y manejarlos individualmente. Adicionalmente, la expresión heteróloga de canales iónicos, receptores y transportadores en ovocitos de *Xenopus laevis* y la aplicación de registro de doble microelectrodo han llegado a ser una técnica estándar para el estudio de estructura, función y modulación de los mismos.

Soluciones

- a) Solución OR-2 (en mM): NaCl 82.5; KCl 2.5; MgCl₂ 1; HEPES 5.
- b) Solución ND-96 (en mM): NaCl 96; KCl 2.5; MgCl₂ 1; CaCl₂ 1.8; HEPES 5, ácido pirúvico 5; teofilina 0.5; gentamicina 50 μ g/ml. pH 7.6.
- c) Solución para registro (en mM): NaCl 96; KCl 2.5; MgCl₂ 1, BaCl₂ 1, HEPES 5. pH 7.6.
- d) Soluciones con JNJ7777120: JNJ7777120 disuelta en solución para registro y se ajustó el pH a 7.6.
- e) Soluciones con lidocaína: lidocaína disuelta en solución para registro y se ajustó el pH a 7.6.

Metodología para obtención de ovocitos

Anestesia

Se seleccionó una rana *Xenopus laevis* (*Xenopus* 1; Ann Arbor, MI. USA), fue anestesiada por inmersión (30 minutos) en una solución al 0.2 % de ácido-3-amino-benzoico-etil-ester (Tricaina;

Sigma Chemical Co. S. Louis, MO), posteriormente se sometió a una cirugía abdominal para remover lóbulos ováricos, en donde se encuentran contenidos los ovocitos.

Cirugía

Se realizó una pequeña incisión de aproximadamente 5 mm en el abdomen y se removieron secciones de los lóbulos ováricos cortando porciones pequeñas. Se colocaron las porciones en una caja de Petri que contenía solución OR-2. Durante la cirugía, la rana estuvo sobre un refrigerante congelante con el propósito de que se mantuviera la rana anestesiada por el frío. La rana se mantuvo hidratada en todo momento durante la cirugía.

Proceso enzimático

Los lóbulos ováricos se colocaron en un tubo de ensayo con colagenasa (Colagenasa tipo 1A; Sigma Chemical Co. S. Louis, MO) a una concentración de 1.4 mg/mL disuelta en solución OR-2. Se realizaron tres periodos de agitación mecánica, dos periodos de 30 minutos y uno de tiempo variable. Entre cada periodo se realizó un lavado (utilizando solución OR-2) y se cambió la solución enzimática. Posterior a la digestión enzimática y mecánica, los ovocitos se colocaron en una caja de Petri que contenía solución ND-96. Los ovocitos se dejaron reposar de 12 a 18 horas antes de su manejo y selección.

Selección de ovocitos

Se seleccionaron sólo los ovocitos que cumplieron con las siguientes características: una forma esférica bien definida con una división clara entre ambos polos (animal y vegetal), un diámetro aproximado de 1 mm (diámetro correspondiente a los estadios V y VI). Se seleccionaron grupos de 40 a 60 ovocitos para la transfección.

Metodología para expresión de canales de sodio

Inyección de ovocitos

Para la micro-inyección se empleó un microinyector automático (Nanoliter 2000 Pump-head y Micto4™ pump controller, WPI, Sarasota, FL. USA). Los ovocitos seleccionados fueron inyectados con el ADNc que codifica para la subunidad α del canal rNav1.4 y el ADNc que codifica para la subunidad β_1 (proporción 1.5:1.5:2). Posteriormente, los ovocitos se incubaron en solución ND-96 durante un periodo de 18 a 30 horas hasta el momento de su registro. El

porcentaje de expresión de los canales voltajes dependientes de los ovocitos se evaluó de manera directa, sometiendo a registro electrofisiológico a cada ovocito.

Metodología para el registro electrofisiológico

Los registros de fijación de voltaje se desarrollaron en ovocitos después de post-inyección a temperatura ambiente (22–23°C) utilizando la técnica de fijación de voltaje con 2 microelectrodos (Kaplan, 2001); para el registro de la corriente de sodio (I_{Na}), se utilizó un amplificador Warner OC-725C (Warner Instrument Corp., Hamden, CT. USA) comandado mediante el programa pClamp 10.2 (Axon Instrument, Union City, CA, USA). Los electrodos (TW120F-6, WPI, Sarasota, FL, USA) se llenaron con KCl 3 M, teniendo una resistencia final de 0.5 a 1.5 MΩ.

Durante el desarrollo de los protocolos experimentales siempre se mantuvo un flujo permanente y constante de la solución de registro que bañan a la célula sometida al registro electrofisiológico. Se utilizó un sistema electrónico de válvulas operadas a distancia por un circuito controlador programable y compatible con la PC (Val-508®, CIDES Tecnología, Puebla, Pue., México). Este sistema permite una velocidad de perfusión de 1.5 mL/min asegurando un recambio completo en un tiempo estimado de un minuto. El volumen de la cámara de registro es de 1.2 mL.

Criterios de inclusión y exclusión

Se trabajó y registró ovocitos con corrientes mayores a 1 μ A y menores a 6 μ A, y con una corriente de fuga menor a 0.1 μ A para minimizar los errores (Krafte, 1991).

Aplicación de JNJ7777120

Los ovocitos transfectados se registraron con los protocolos descritos a continuación; primero se registraron en condiciones control, posteriormente se aplicó el fármaco mediante perfusión y una vez que se estableció el efecto, se volvieron a registrar los protocolos en presencia de JNJ7777120.

Protocolos experimentales

Todos los protocolos de experimentación fueron realizados en dos condiciones; en ausencia y en presencia de JNJ7777120. Para generar la corriente de sodio y estudiar sus diferentes estadios se procedió de acuerdo a los protocolos I al VI descritos a continuación.

Protocolo I. Relación corriente contra voltaje

Se aplicó un protocolo de pulsos despolarizantes partiendo de un potencial de sostenimiento de -100 mV hasta +50 mV con incrementos de 10 mV y de -100 mV hasta +55 mV con incrementos de 5 mV (Figura 8 A). Para construir la relación corriente contra voltaje se midió la magnitud del pico de la corriente generada en cada paso de voltaje y se normalizó contra el pico máximo de la corriente obtenida en condiciones control. Estos valores fueron graficados en función del potencial de membrana (E_m).

Protocolo II. Inactivación de estado estable

Para analizar el efecto de JNJ7777120 sobre la inactivación de estado estable se empleó un protocolo de doble pulso, que parte de un potencial de sostenimiento de -100 mV y se aplicó pulsos condicionantes con duración de un milisegundo de -120 mV a +20 mV con incrementos de 10 mV y posteriormente se aplicó el pulso de prueba al voltaje al que se observó la máxima corriente durante el protocolo de relación corriente contra voltaje, con una duración de 25 ms (Figura 8 A).

Una vez obtenidos estos datos se procedió a efectuar la construcción del gráfico. Se midió la amplitud de la corriente al pico de la corriente producida por el pulso de prueba y graficando en función del potencial de membrana del pulso condicionante; posteriormente a ello, los datos normalizados se ajustaron utilizando la ecuación de Boltzmann:

$$f = A_1 / \left(1 + \exp \left[\frac{V - V_{1/2}}{k} \right] \right) + A_2$$

Donde:

$V_{1/2}$ = voltaje medio de inactivación

k = pendiente

A_1 = Amplitud de la relación

A_2 = Amplitud del componente cuando no inactiva

Protocolo III. Conductancia del canal de sodio voltaje dependiente

A partir de los datos obtenidos de la relación corriente contra voltaje se determinó el efecto de JNJ7777120 sobre la conductancia del canal de sodio voltaje dependiente. Los puntos mostrados en los gráficos de la conductancia se obtuvieron mediante el empleo de la siguiente ecuación:

$$g_{Na} = I_{Na}/(E_m - E_{Na})$$

Donde:

g_{Na} = conductancia de la membrana al ion sodio (Na^+)

I_{Na} = la amplitud de la corriente que corresponde a cada valor del potencial de membrana (E_m)

E_{Na} = Potencial de equilibrio del Na^+ .

Los datos obtenidos mediante esta ecuación tanto en condiciones control como en presencia de JNJ7777120 fueron normalizados en relación a la conductancia máxima (g_{max}) y fueron ajustados con la ecuación de Boltzmann.

Protocolo IV. Recuperación de la inactivación

Para la recuperación de la inactivación de la I_{Na} , se utilizó un protocolo de doble pulso. La I_{Na} fue en primer lugar inactivada por medio de la aplicación de un pulso condicionante de 500 ms a -20 mV partiendo de un potencial de sostenimiento de -100 mV para después regresar al potencial de sostenimiento durante un intervalo de tiempo con crecientes variaciones (Δt) antes de aplicar un segundo pulso (pulso de prueba) al voltaje en que se observó el pico de corriente máxima durante 20 ms (Figura 8 c).

Para obtener el curso temporal de la recuperación de la inactivación se requirió de la medición de la relación entre la amplitud de la I_{Na} generada en consecuencia del pulso de prueba y la magnitud de la I_{Na} como consecuencia del pulso condicionante, dicha relación fue graficada en función de Δt .

Los datos que fueron obtenidos se ajustaron empleando una doble exponencial que a continuación se muestra:

$$f = 1 - \left\{ A_1 / \left[1 + \exp\left(-\frac{x}{\tau_1}\right) \right] + A_2 \left[1 + \exp\left(-\frac{x}{\tau_1}\right) \right] \right\}$$

Donde:

A_1 y A_2 = son amplitudes

τ_1 y τ_2 = son los componentes rápido y lento de la constante de tiempo de recuperación, respectivamente.

Protocolo V. Dependencia de uso y frecuencia

El bloqueo dependiente se estudió con un protocolo de trenes de estimulación de 20 pulsos con un potencial de sostenimiento de -100 mV al pulso de voltaje en que se observó el pico de corriente máximo con una duración de 30 ms (Figura 8 D). Dichos trenes de estimulación se aplicaron en las siguientes frecuencias: 1 Hz, 2 Hz y 5 Hz.

El bloqueo consecuencia de la frecuencia se analizó mediante la medición de la relación entre la amplitud de corriente generada por el pulso número 20 y la que se produjo con el pulso número 1 del tren de estimulación; este procedimiento se aplicará a los diferentes estados de la célula, es decir, tanto en control como en presencia de JNJ7777120 a las tres distintas frecuencias. Todos los datos obtenidos fueron graficados en función del número del pulso.

Protocolo VI. Curso temporal

El tiempo de instalación de JNJ7777120 en el canal de sodio se estudió utilizando pulsos cuadrados con una duración de 30 ms con un potencial de sostenimiento de -100 mV al pulso de voltaje en que se observó el pico de corriente máximo. Los pulsos cuadrados fueron aplicados cada 10 segundos.

Protocolo VII. Competencia de fármacos

Para determinar si el sitio de unión de JNJ7777120 en el canal de sodio es el que se propone, se co-aplicó 760 μ M de lidocaína en dos condiciones. En el primer caso, se aplicó 760 μ M de lidocaína utilizando el protocolo VI hasta que se estableció el bloqueo seguido del protocolo I, posteriormente, manteniendo el flujo con lidocaína, se aplicó 16 μ M de JNJ7777120 utilizando los mismos protocolos. En el segundo caso, se aplicó 16 μ M de JNJ7777120 hasta que se

estableció el bloqueo y manteniendo la presencia de JNJ777120, se aplicó 760 μM de lidocaína. Al final se comparó el bloqueo obtenido de la medición de las curvas corriente-contra voltaje.

Análisis estadístico

Los datos fueron presentados como el promedio \pm el error estándar de la media. La significancia de las diferencias entre medias se obtuvo con la prueba t-Student pareada; se consideró estadísticamente significativo una diferencia cuando $p < 0.05$.

Los registros fueron realizados por medio de los programas computacionales pClamp 10.2 (Axon Instruments, LLC, CA, USA). Para la realización de las gráficas y ajustes se utilizaron los programas OriginPro 9.1 (OriginLab Corp. Northampton, MA, USA) y SigmaPlot 12.5 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

En los casos de inactivación de estado estable para la corriente de I_{Na} y la curva dosis-efecto, los datos experimentales fueron ajustados con las ecuaciones de Boltzmann y Hill, respectivamente.

Bioética

Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron de conformidad con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Consejo Mexicano para el Cuidado de los Animales (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999) y The National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (The National Academies Press, Washington, DC, 2011).

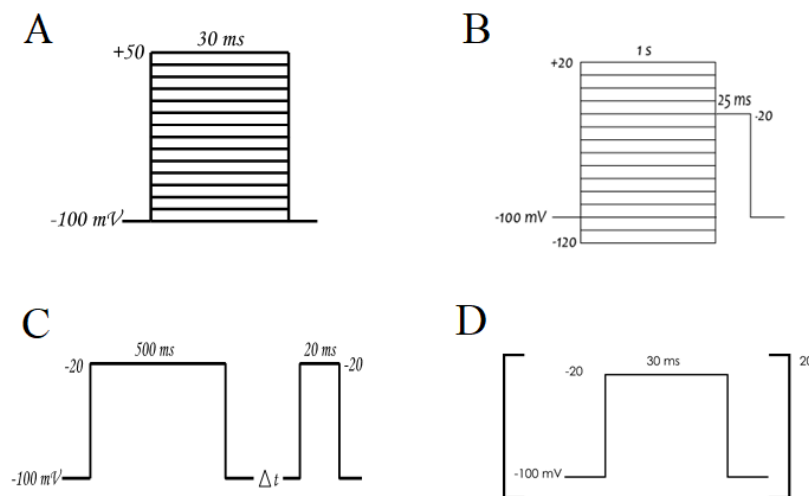


Figura 8. Protocolos de estimulación. A: Protocolo de activación. B: Protocolo de inactivación de estado estable. C: protocolo de la recuperación de la inactivación. D: Protocolo de uso y frecuencia.

Resultados

Bloqueo dependiente de la concentración

Para determinar la concentración efectiva CE_{50} del fármaco JNJ7777120, se procedió a realizar una curva dosis efecto. Se aplicaron las concentraciones de 1, 3, 10, 30 y 100 μM de JNJ7777120 y se observó que la corriente se redujo en un 2.23, 4.51, 13.98, 24.45 y 32.52%, respectivamente, el bloqueo fue cuantificado como una reducción en la amplitud al pico de la corriente de sodio (I_{Na}), siendo éste significativo a partir de 1 μM ($p < 0.001$). No se detectaron diferencias significativas entre una concentración y la siguiente, lo cual sugiere que el bloqueo es independiente de la concentración. En la Figura 9, se muestra el ajuste obtenido de la curva concentración-efecto mediante el uso de la ecuación de Hill de cuatro parámetros ($R^2 = 0.99$). El cálculo del intervalo de confianza y del intervalo de predicción al 95%, también sugieren que el bloqueo de la corriente es independiente de la concentración. El bloqueo máximo en el canal de sodio $r\text{Na}_v1.4 + \beta_1$ fue del 35% y el ajuste arroja un valor de $IC_{50} = 16 \pm 2 \mu\text{M}$ y un coeficiente de Hill de 1.20 ± 0.08 . Para los siguientes protocolos, se utilizó la IC_{50} .

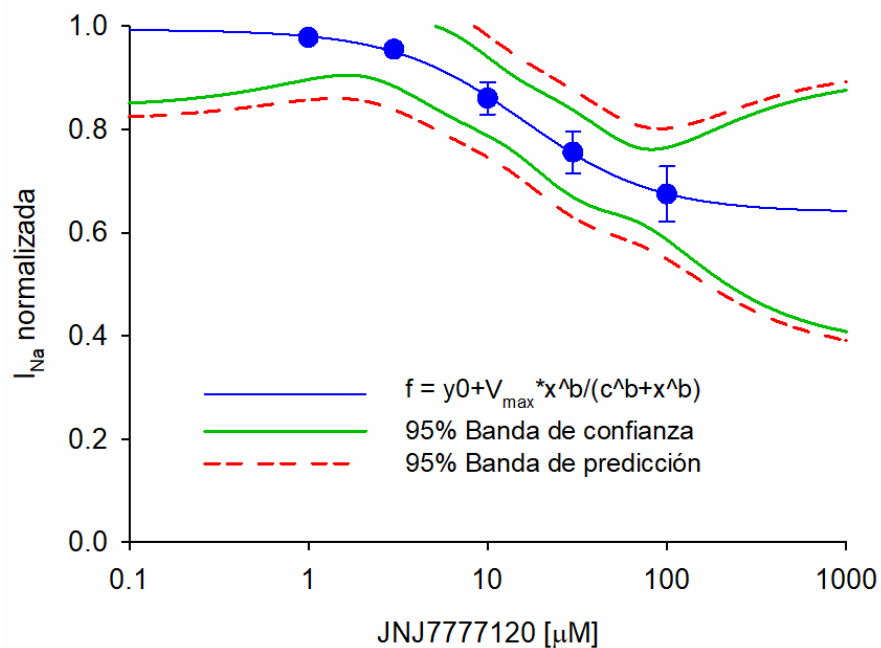


Figura 9. Bloqueo dependiente de concentración de JNJ7777120. Se muestra el bloqueo producido por las concentraciones 1, 3, 10, 30 y 100 μM con una n de 3, 3, 5, 5 y respectivamente. Los datos se graficaron y ajustaron con una ecuación de Hill, la cual proporcionó una EC_{50} de 16 μM , un coeficiente de Hill de 1.20 ± 0.08 y un bloqueo máximo del 35%. Los datos representan el promedio \pm el error estándar.

Relación Corriente contra Voltaje

En condiciones control, la relación corriente contra voltaje del canal $rNa_v1.4 + \beta1$ indica que el canal empieza a activarse a partir de -40 mV, registrando un pico de corriente alrededor de -25 mV y un potencial de equilibrio de $+20$ mV aproximadamente. La relación corriente contra voltaje fue construida midiendo la magnitud de la corriente al pico generada en cada paso de voltaje, posteriormente se graficaron en función del potencial de membrana. En la Figura 10 se observa que JNJ7777120 desplazó el pico de corriente en 5 mV a valores despolarizantes, provocó un bloqueo aproximadamente del 17 % y hubo un desplazamiento del potencial de equilibrio de 20 mV a valores despolarizantes.

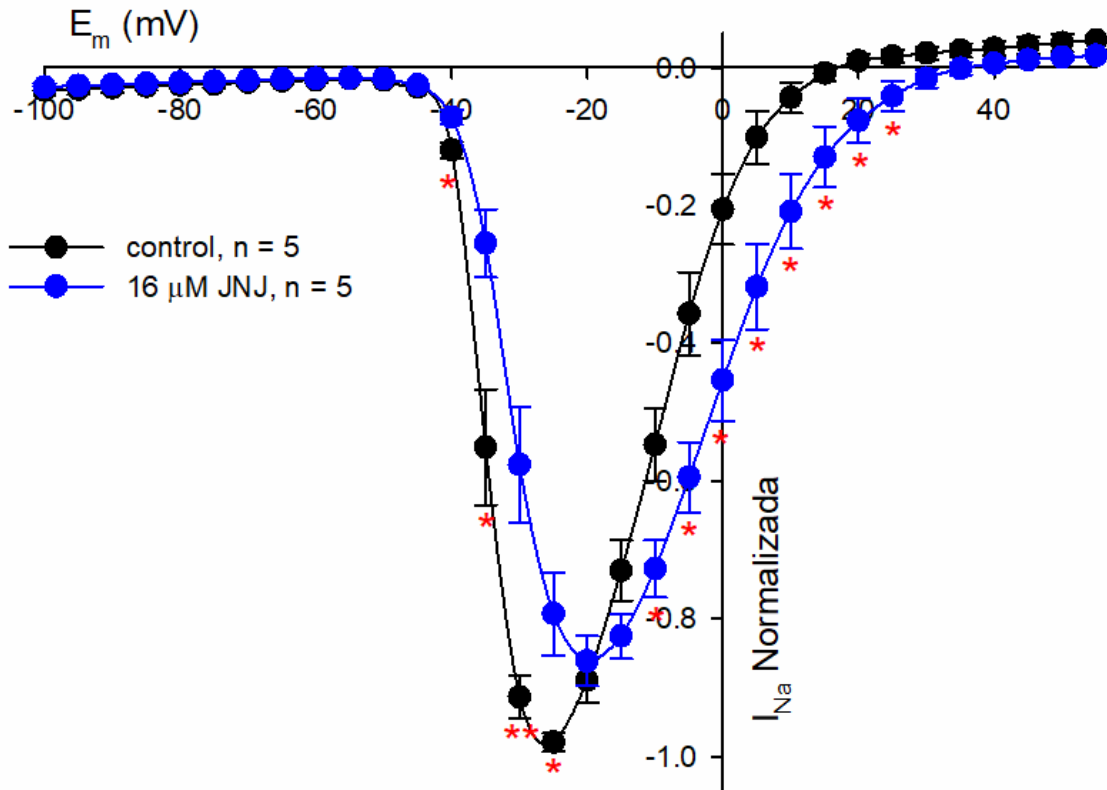


Figura 10. Relación voltaje contra corriente del canal de sodio voltaje dependiente $rNa_v1.4 + \beta1$ en condiciones control y en presencia de $16 \mu\text{M}$ de JNJ7777120. Los datos representan el promedio \pm el error estándar. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

Inactivación de estado estable y conductancia

Los datos fueron obtenidos mediante el protocolo de inactivación descrito en materiales y métodos. Para la obtención de las gráficas se procedió a medir la magnitud del pico de la corriente ocasionada por el pulso de prueba y se graficaron en función del potencial de membrana del pulso condicionante, posteriormente se normalizaron los datos obtenidos. Los datos fueron ajustados empleando la ecuación de Boltzmann y los parámetros obtenidos se presentan en Tabla 2. El fármaco desplazó ligeramente la curva de inactivación de estado estable hacia potenciales hiperpolarizantes (Figura 11) y modificó significativamente la pendiente k (Tabla 2).

El cambio originado en la conductancia del canal fue evaluado al calcular la conductancia (g_{Na}) de los datos resultantes de la relación corriente contra voltaje mostrada en la Figura 10. La conductancia fue calculada con los valores experimentales del potencial de equilibrio para cada célula. La aplicación de $16 \mu\text{M}$ JNJ777120 desplazó significativamente la curva de conductancia hacia potenciales despolarizantes e indujo un cambio significativo en la pendiente m (Figura 11 y Tabla 2).

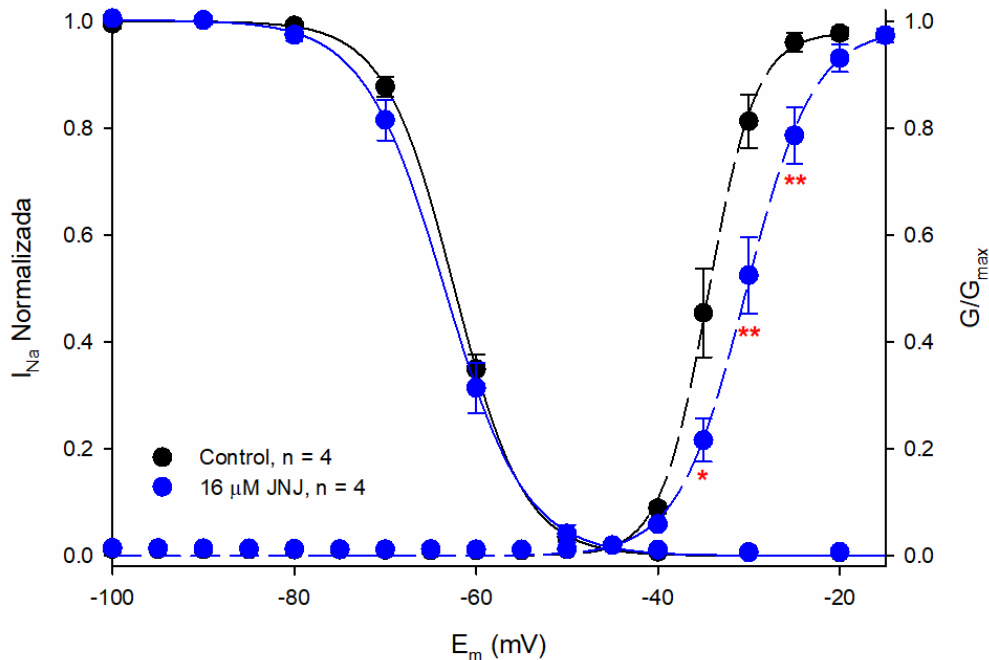


Figura 11. Curvas de inactivación de estado estable y conductancia del canal de sodio rNav1.4 + β1 en presencia y ausencia de $16 \mu\text{M}$ de JNJ777120. El voltaje medio fue comparado con respecto al control y es mostrado en la Tabla 2. Los datos representan el promedio ± el error estándar. * : $p < 0.05$ y ** : $p < 0.01$.

Tabla 2. Valores de inactivación y conductancia del canal de sodio rNav1.4 + β 1 en presencia y ausencia de 16 μ M de JNJ7777120.

| Condición | Inactivación de estado estable | | Conductancia | |
|--------------------------|--------------------------------|---------------------|-----------------------|--------------------|
| | $V_{1/2}$ | k | $V_{1/2}$ | m |
| Control | -62.40 ± 0.08 | 3.83 ± 0.07 | -34.35 ± 0.25 | 2.62 ± 0.12 |
| 16 μ M de JNJ7777120 | -63.49 ± 0.10 | 4.42 ± 0.08 *** | -29.61 ± 0.19 *** | 3.83 ± 0.21 ** |

Nota. Los datos representan el promedio \pm el error estándar. **: $p < 0.01$ y ***: $p < 0.001$.

Cinética de inactivación

El decaimiento de la corriente (o cinética de inactivación) se ajustó, célula por célula a una ecuación monoexponencial y el promedio de las constantes de tiempo de inactivación (τ) en presencia y ausencia del fármaco fueron comparadas. Los datos indican que JNJ7777120 (Figura 12) enlentece significativamente la τ de inactivación, excepto a los voltajes de -25 mV y 0 mV donde τ es más rápida.

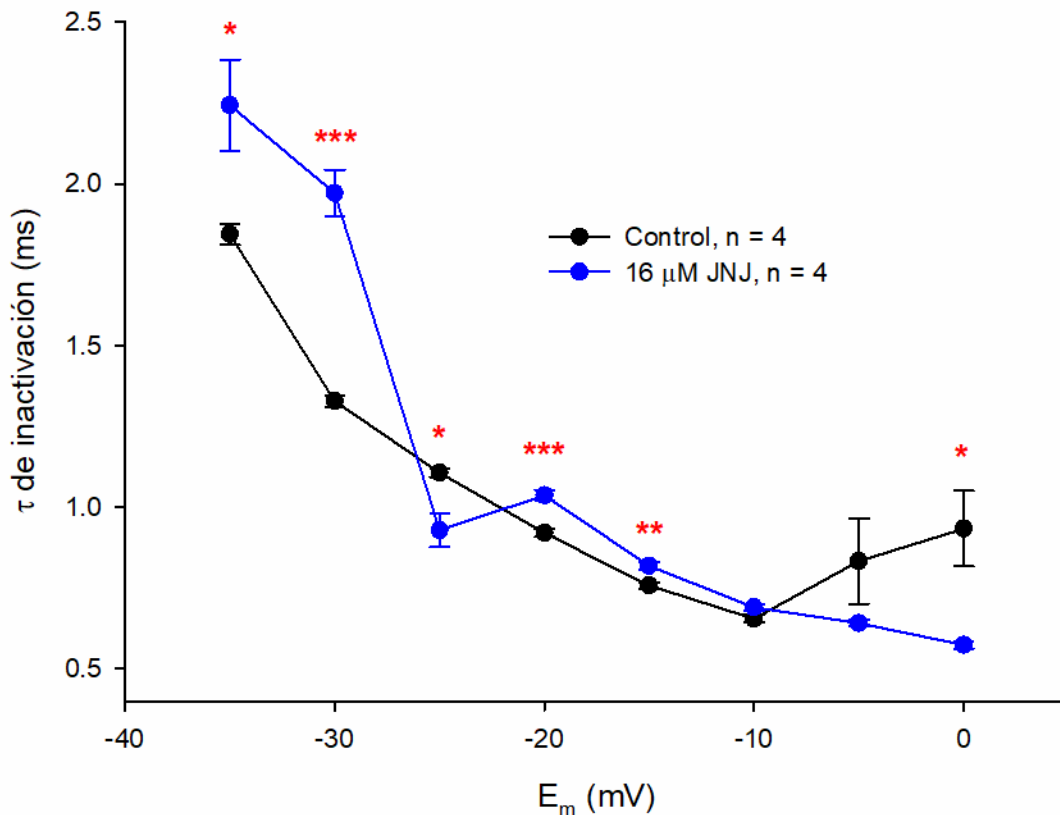


Figura 12. Constante de tiempo de inactivación del canal rNav1.4 + β 1 en presencia y ausencia de 16 μ M de JNJ7777120. Se compara cada valor control contra su respectivo valor en presencia de JNJ7777120. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ y ***: $p < 0.001$.

Curso temporal de la recuperación de la inactivación

La recuperación de la inactivación del canal de sodio no se vio modificada en presencia de 16 μM de JNJ7777120 (Figura 13). La cinética de recuperación de la inactivación fue ajustada a una ecuación biexponencial. La Tabla 3 muestra las constantes de tiempo de recuperación rápida τ_1 y lenta τ_2 obtenidas.

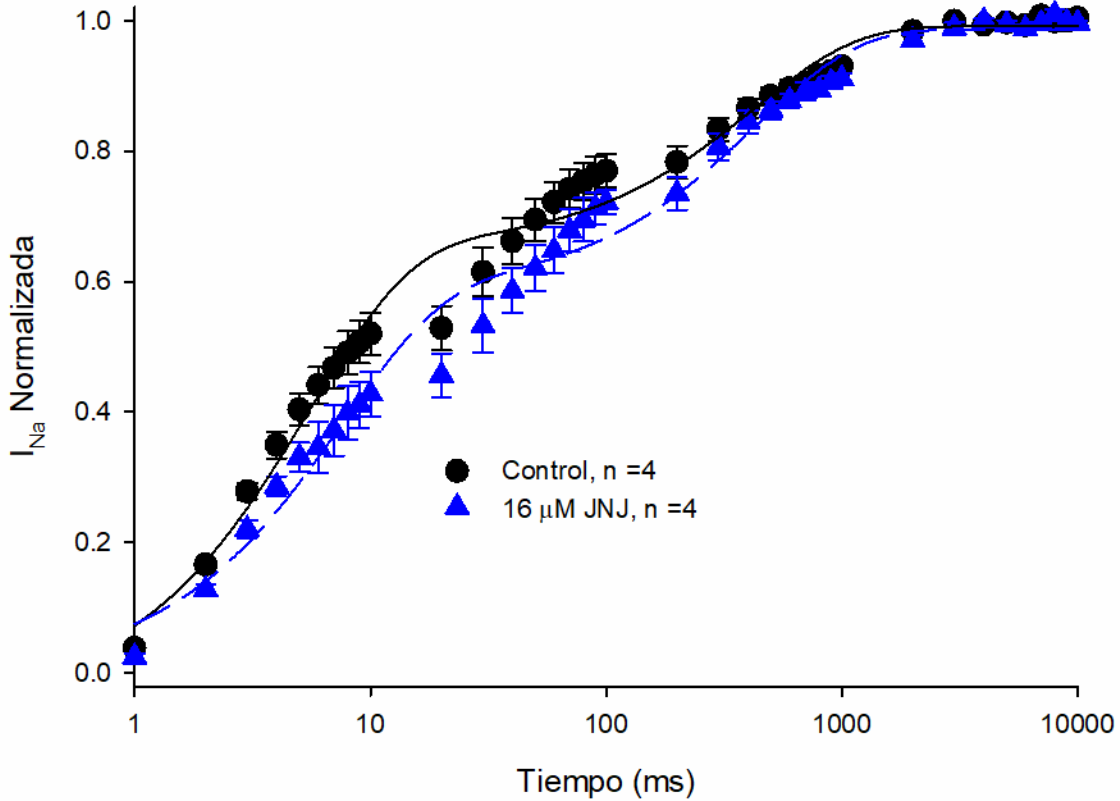


Figura 13. Recuperación de la inactivación del canal rNav1.4 + β_1 en condiciones control y en presencia de 16 μM de JNJ7777120. Los valores de τ_1 y τ_2 se presentan en la

Tabla 3. Constantes de tiempo de recuperación de la inactivación de canales Nav1.4 + β_1 en presencia y ausencia de JNJ7777120

| Condición | τ_1 | τ_2 |
|--------------------------------|-----------------|--------------------|
| Control | 3.75 ± 0.36 | 295.33 ± 43.05 |
| 16 μM de JNJ7777120 | 5.13 ± 0.61 | 299.08 ± 38.95 |

Nota. Los datos representan el promedio de cada grupo \pm el error estándar.

Bloqueo dependiente de uso y frecuencia

Se aplicaron depolarizaciones repetitivas de -25 mV y de -20 mV, barras negras y azules, respectivamente en la Figura 14 a diferentes frecuencias sin observar ninguna acumulación de la inactivación en control ni en presencia de JNJ777120, lo cual indica que este fármaco no induce bloqueo dependiente de uso ni frecuencia en canales $Na_v1.4 + \beta 1$.

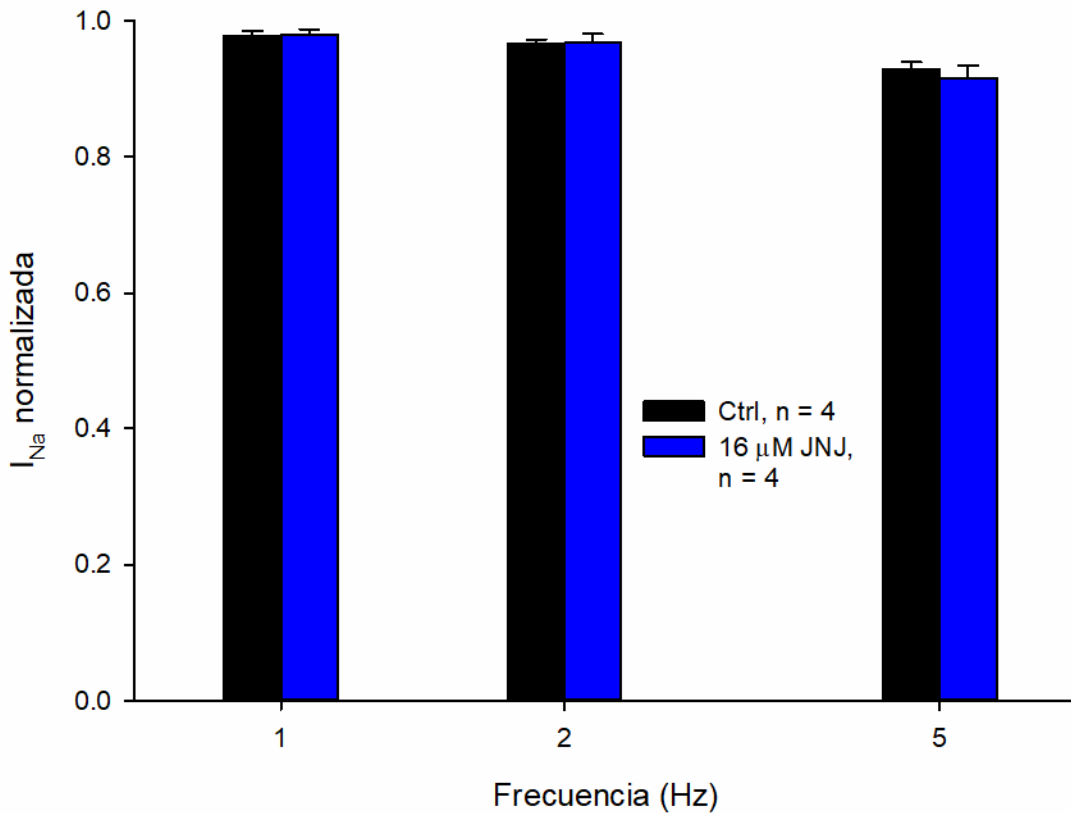


Figura 14. Bloqueo dependiente de uso y frecuencia en condiciones control y en presencia de 16 μ M de JNJ777120. Los datos representan el porcentaje al pulso 20 con respecto al promedio del pulso 1 \pm el error estándar.

Curso temporal

Se utilizó el protocolo VI para determinar el tiempo de instalación y de disociación de JNJ777120 en el canal de sodio. Después de un tiempo de 1.8 minutos en solución control, el fármaco fue perfundido por un total de 32.1 minutos. La cinética de instalación y de disociación fueron ajustadas a una ecuación monoexponencial de tres parámetros (Figura 15), Las constantes de tiempo indican que el fármaco se lava 3.9 veces más rápido de lo que se instala.

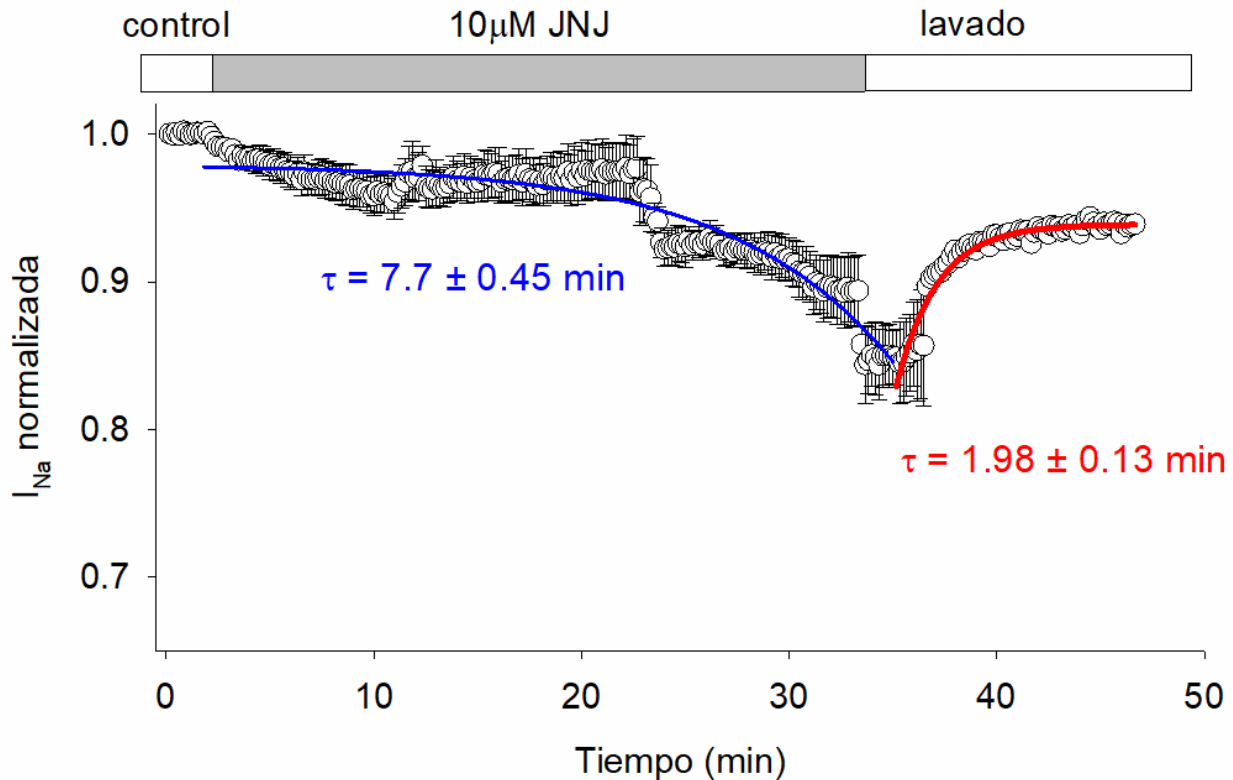


Figura 15. Curso temporal e instalación de efecto de 16 μ M de JNJ777120. Los datos representan el promedio de cada grupo \pm el error estándar. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ y ***: $p < 0.001$.

Determinación del sitio de unión a JNJ777120

Para determinar el sitio unión del fármaco JNJ777120 al canal de sodio, se emplearon dos metodologías, en la primera se probó el efecto del fármaco sobre el mutante del sitio de unión a anestésicos locales del canal de sodio F1579A y en el segundo caso se coaplicó JNJ777120 con lidocaína, un anestésico local cuyo bloqueo tónico depende de la presencia de la fenilalanina 1579.

Relación corriente contra voltaje en F1579A + $\beta 1$

En la Figura 16, se observa que JNJ777120 no bloquea la corriente de sodio del mutante, al contrario, se observa un incremento no significativo ($p = 0.08$) de la corriente del 6%. Esto indica que la presencia de la F1579 es necesaria para el bloqueo inducido por JNJ777120 en canales $Na_v1.4 + \beta 1$. Sin embargo, el fármaco induce un desplazamiento del pico de corriente del mutante, de 5 mV a valores hiperpolarizantes.

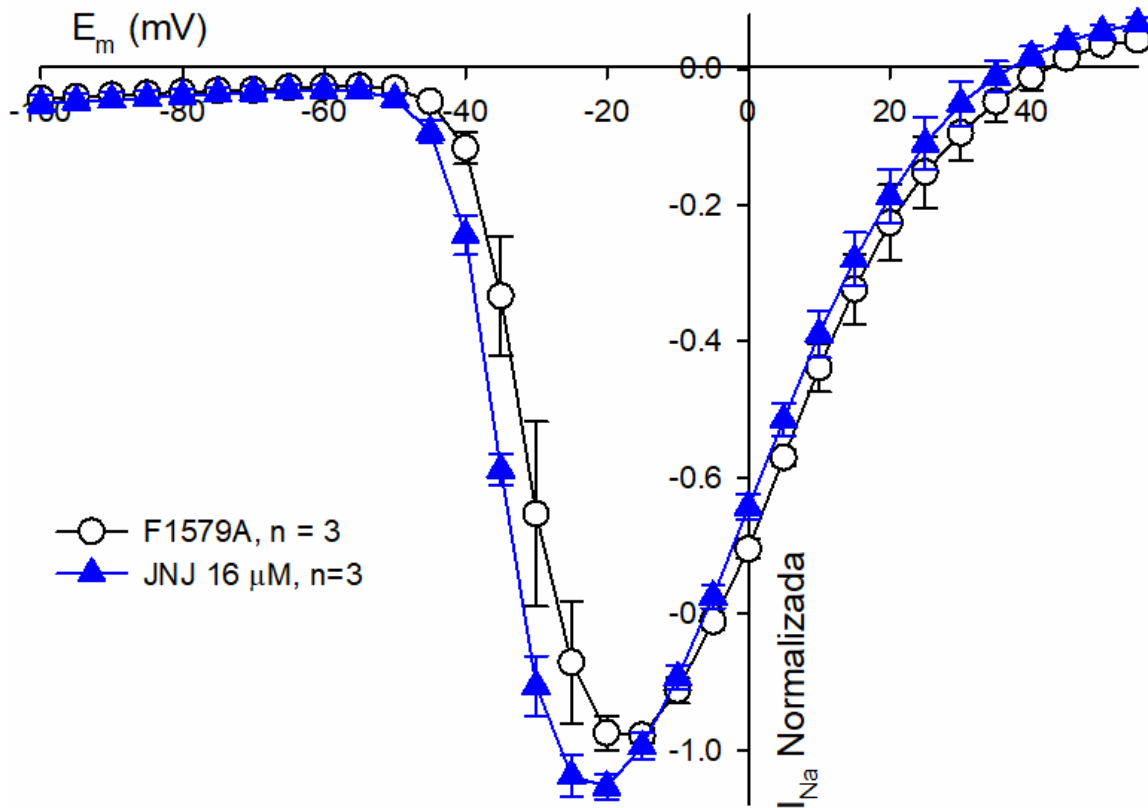


Figura 16. Relación voltaje contra corriente del mutante del canal de sodio voltaje dependiente F1579A en condiciones control y en presencia de 16 μ M de JNJ777120. Los datos representan el promedio \pm el error estándar.

Inactivación de estado estable y conductancia en F1579A + $\beta 1$

JNJ7777120 indujo un desplazamiento de la curva de inactivación hacia valores hiperpolarizantes sin alterar la curva de conductancia (Figura 17). No hubo cambios significativos en el resto de los parámetros (Tabla 4).

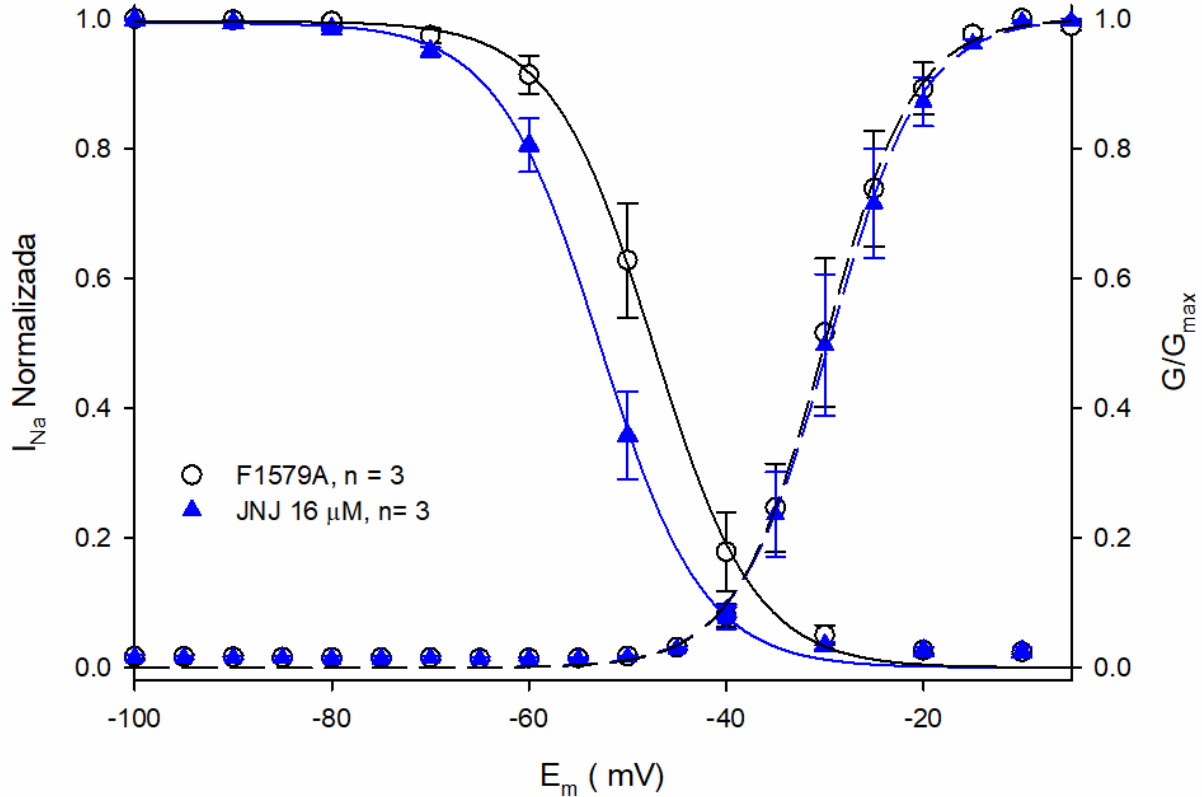


Figura 17. Curvas de inactivación de estado estable y conductancia del canal mutante F1579A + $\beta 1$ en presencia y ausencia de 16 μM de JNJ7777120. El voltaje medio fue comparado con respecto al control y es mostrado en la Tabla 4. Los datos representan el promedio \pm el error estándar.

Tabla 4. Valores de inactivación y conductancia del canal mutante de sodio F1579A en presencia y ausencia de JNJ7777120.

| Condición | Inactivación de estado estable | | Conductancia | |
|--------------------|--------------------------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| | $V_{1/2}$ | k | $V_{1/2}$ | m |
| F1579A | -47.39 ± 0.31 | 5.14 ± 0.26 | -29.95 ± 0.20 | 4.50 ± 0.17 |
| 16 M de JNJ7777120 | -52.79 ± 0.34 *** | 5.22 ± 0.29 | -29.53 ± 0.21 | 4.68 ± 0.17 |

Nota. Los datos representan el promedio \pm el error estándar. ***: $p < 0.001$.

Cinética de inactivación

Los cambios en la τ de inactivación son significativos desde -25 mV y -20 mV. JNJ enlentece la τ de inactivación excepto para -25 mV donde la τ es más rápida (Figura 18).

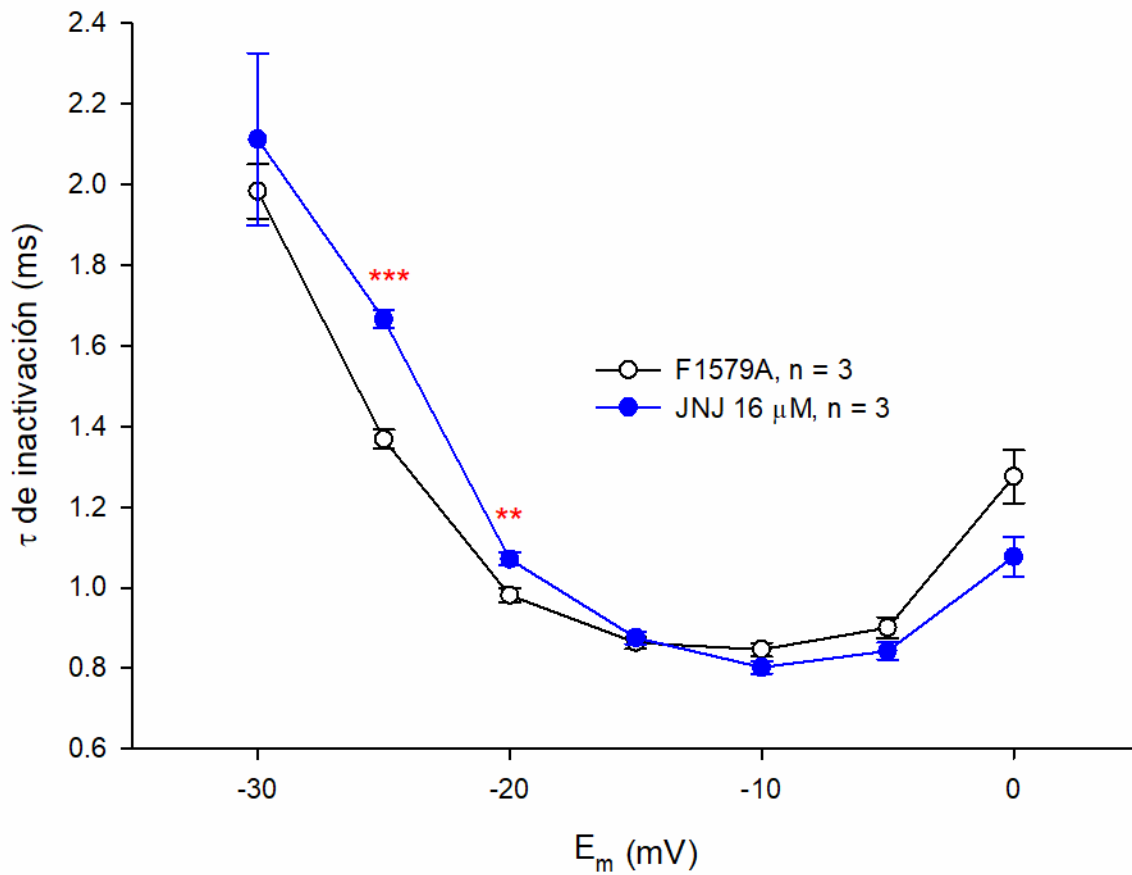


Figura 18. Constante de tiempo de inactivación del canal rNav1.4 + β 1 en presencia y ausencia de 16 μ M de JNJ7777120. Se compara cada valor control contra su respectivo valor en presencia de JNJ7777120. **: $p < 0.01$ y ***: $p < 0.001$.

Curso temporal de la recuperación de la inactivación

Al aplicarse el protocolo para estudiar la recuperación de la inactivación (Figura 19), en el canal mutante F1579A no se observaron cambios en presencia de JNJ7777120. En Figura 19 y la Tabla 5 se muestran los resultados y los ajustes de la recuperación rápida y lenta.

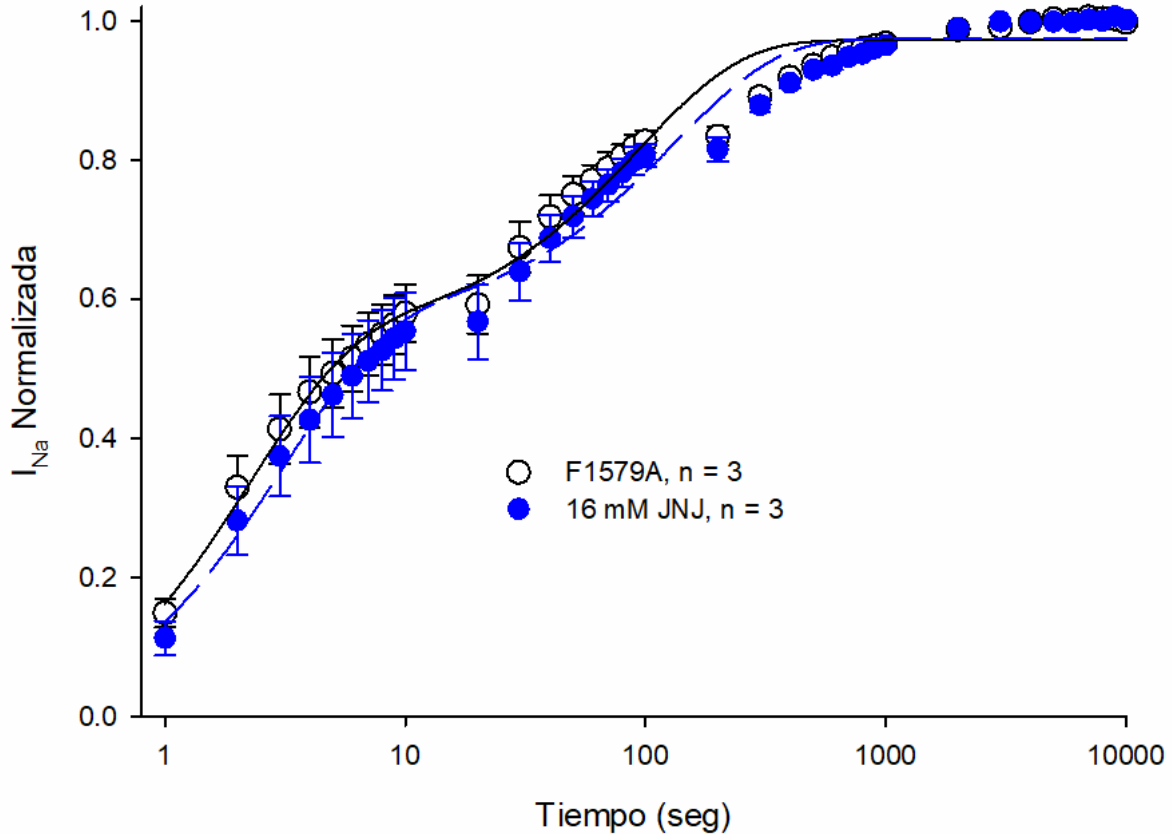


Figura 19. Recuperación de la inactivación del canal mutante F1579A en condiciones control y en presencia de 16 μ M de JNJ7777120. Los valores de τ_1 y τ_2 se presentan en la Tabla 5. Los datos representan el promedio de cada grupo \pm el error estándar.

Tabla 5. Constantes de tiempo de recuperación de la inactivación

| Condición | τ_1 | τ_2 |
|--------------------------|-----------------|-------------------|
| F1579A | 1.51 ± 0.29 | 64.41 ± 7.48 |
| 16 μ M de JNJ7777120 | 2.09 ± 0.35 | 90.69 ± 12.95 |

Nota. Los datos representan el promedio de cada grupo \pm el error estándar.

Bloqueo dependiente de uso y frecuencia

No se observó un bloqueo dependiente de uso y frecuencia en el canal mutante F1579A en presencia de JNJ7777120. En Figura 20 se muestra el porcentaje de bloqueo obtenido bajo las frecuencias de 1, 2 y 5 Hz.

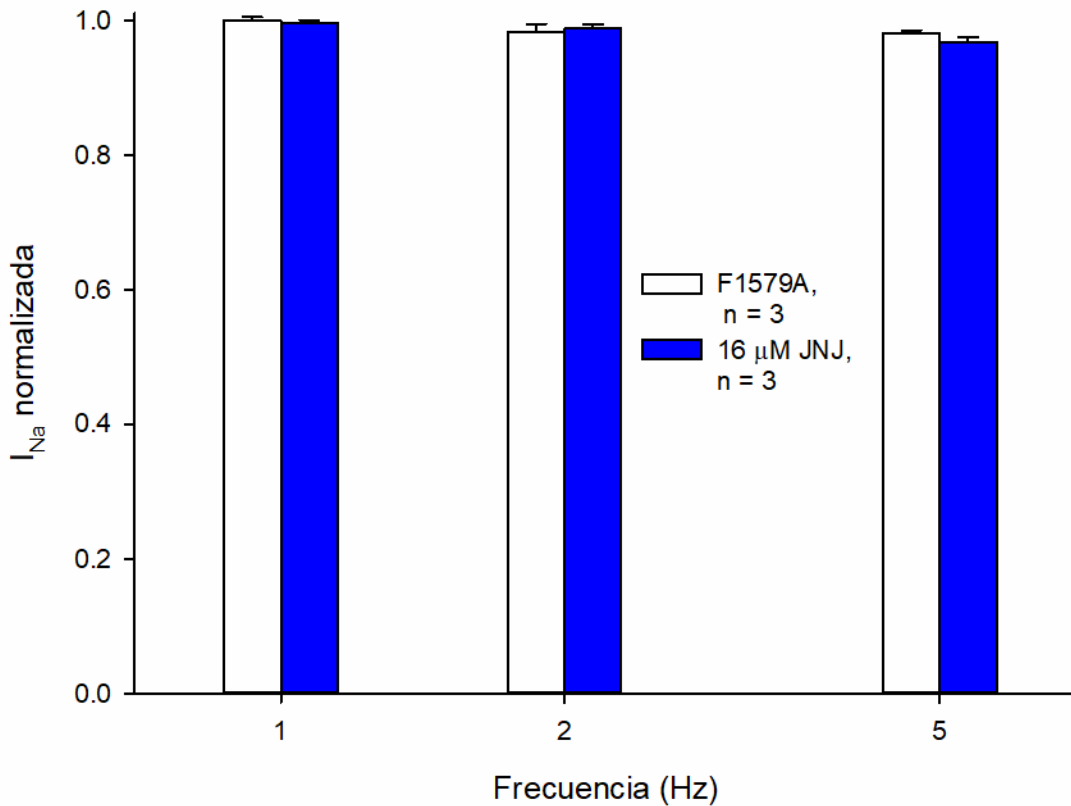


Figura 20. Bloqueo dependiente de uso y frecuencia en el canal mutante F1579A en condiciones control y en presencia de 16 μ M de JNJ7777120. Los datos representan el porcentaje al pulso 20 con respecto al pulso 1 \pm el error estándar.

Tabla 6. Resumen de valores obtenido de los protocolos tanto en el canal nativo como en el mutante del sitio de unión a anestésicos locales

| | Pico I_{Na} (mV) | Bloqueo JNJ7777120 (16 μ M) | τ de inactivación | Inactivación de estado estable | | Conductancia | | Recuperación de la inactivación | |
|----------|--------------------|---------------------------------|------------------------|--------------------------------|---------------------|-----------------------|--------------------|---------------------------------|---------------------|
| | | | | $V_{1/2}$ | k | $V_{1/2}$ | m | τ_1 | τ_2 |
| WT | -25 | | 1.10 ± 0.01 | -62.40 ± 0.08 | 3.83 ± 0.07 | -34.35 ± 0.25 | 2.62 ± 0.12 | 3.75 ± 0.36 | 295.33 ± 43.05 |
| WT + JNJ | -20 | -17 % | 1.03 ± 0.01 *** | -63.49 ± 0.10 | 4.42 ± 0.08 *** | -29.61 ± 0.19 *** | 3.83 ± 0.21 ** | 5.13 ± 0.61 | 299.08 ± 38.948 |
| MT | -15 | | 0.98 ± 0.01 | -47.39 ± 0.31 | 5.14 ± 0.26 | -29.95 ± 0.20 | 4.50 ± 0.17 | 1.51 ± 0.29 | 64.41 ± 7.48 |
| MT + JNJ | -20 | 6 % *** | 1.07 ± 0.01 ** | -52.79 ± 0.34 *** | 5.22 ± 0.29 | -29.53 ± 0.21 | 4.68 ± 0.17 | 2.09 ± 0.35 | 90.69 ± 12.95 |

Nota. WT = rNav1.4 + β 1; MT = F1579A + β 1. **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.005$.

Competencia de fármacos

Para corroborar que el sitio de unión de JNJ7777120 en el canal rNav1.4 es el sitio de unión a anestésicos locales se utilizó lidocaína que se sabe que bloquea al canal al unirse al sitio de unión a anestésicos locales. Se utilizó la EC_{50} de lidocaína de 760 μ M (Martínez-Morales, 2008). En el primer caso, se aplicó lidocaína y una vez que se instaló el efecto se administró 16 μ M de JNJ7777120 (Figura 21 A), como se observa en la Figura 22, de color verde, el bloqueo inicial por parte de lidocaína se mantuvo. En el segundo caso, se administró primero 16 μ M de JNJ7777120 y una vez que se estableció el bloqueo, se administraron 760 μ M de lidocaína (Figura 22), en este caso, el bloqueo aumentó del 18 ± 2.03 % a 34 ± 0.07 %.

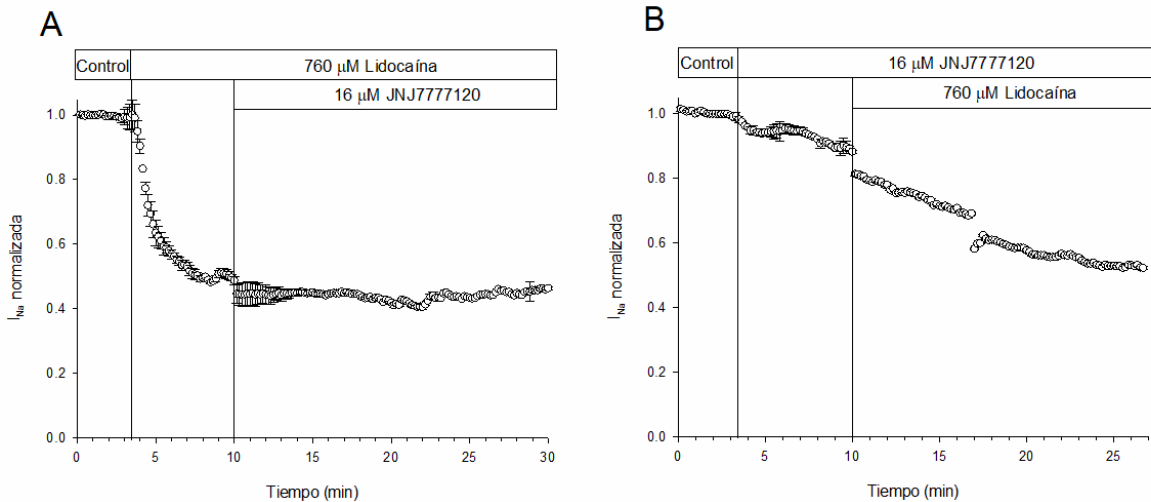


Figura 21. Curso temporal de la coaplicación de JNJ7777120 y lidocaína. A: Se aplicó primero 16 μ M JNJ7777120 y posteriormente 760 μ M de lidocaína. B: Se aplicó primero 760 μ M de lidocaína y posteriormente 16 μ M de JNJ7777120. Los datos representan el porcentaje la disminución de la corriente \pm el error estándar. La $n = 3$ en ambas gráficas.

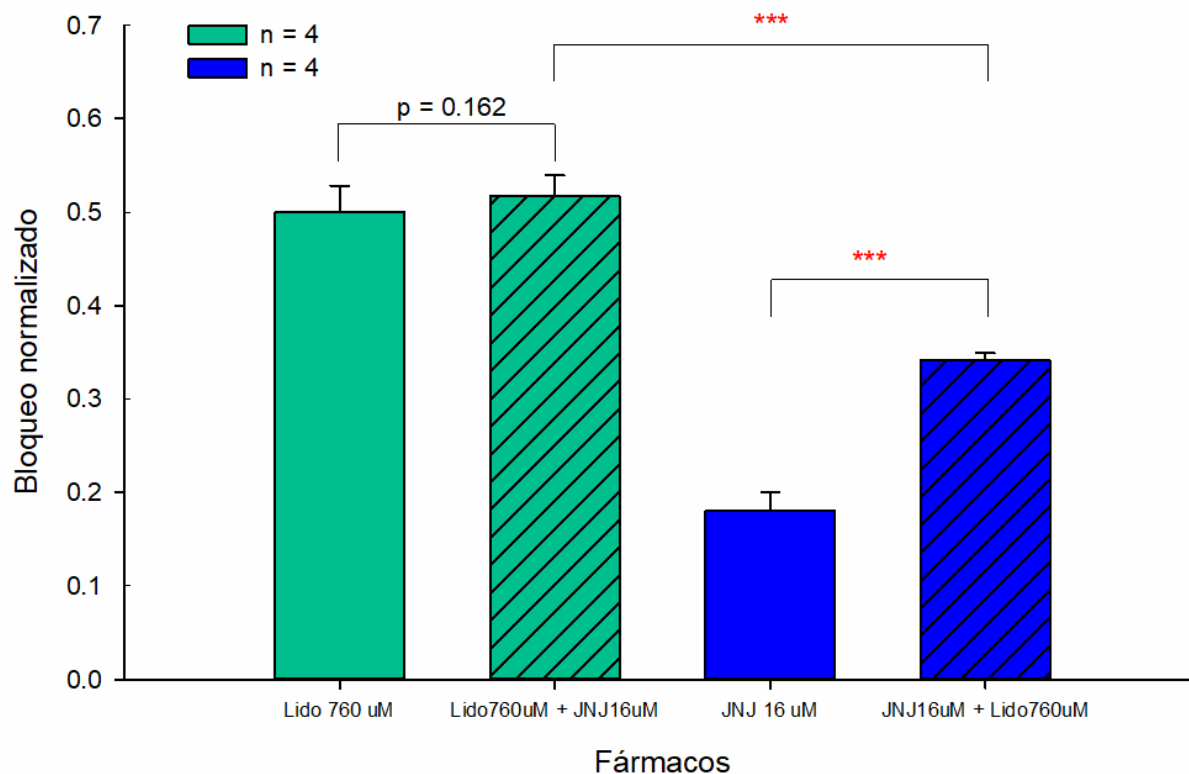


Figura 22. Competencia de fármacos. Se realizó la coaplicación de lidocaína y JNJ7777120 en dos formas. Los datos representan el porcentaje de bloqueo \pm el error estándar. ***: $p < 0.001$.

Simulaciones de *docking* molecular

Con el fin de elucidar los determinantes moleculares de la interacción de JNJ7777120 sobre el canal de sodio $rNa_v1.4$, se realizaron simulaciones computacionales de anclaje molecular (*docking*) sobre un modelo molecular por homología de $Na_v1.4$ (número de acceso Uniprot: P35499) generado en el laboratorio (Islas, 2014) a partir del canal bacterial de sodio, dependiente de voltaje Na_vAb (código PDB: 3RVY). Las simulaciones de *docking* receptor-rígido, ligando-flexible fueron realizadas con el programa VINA (Trott & Olson, 2010).

Inicialmente, el espacio de muestreo (de $82 \times 82 \times 82 \text{ \AA}^3$) incluyó los seis segmentos de cada dominio del canal (*blind docking*) y los resultados de las simulaciones indicaron que el fármaco JNJ7777120, en cualquiera de sus dos posibles estados de protonación (N2H y N6H) ocupa el sitio de unión de anestésicos con una energía libre de unión semejante, formando complejos ligando-receptor energéticamente favorables de -7.3 y -7.2 kcal/mol, respectivamente. En ambos casos

el ligando interactúa con la fenilalanina en la posición 1579, formando una interacción aromática π - π entre su grupo indol y la cadena lateral de este aminoácido (Figura 23 A).

Posteriormente se realizaron simulaciones restringiendo el espacio de muestreo ($40 \times 40 \times 40 \text{ \AA}^3$) al poro del canal y se encontró que, en la solución de menor energía libre de unión además de la interacción aromática π - π , el grupo piperazina ocluye el canal por debajo del filtro de selectividad, interactuando electrostáticamente con la cadena lateral del ácido glutámico y se sitúa próxima a la cadena principal de la lisina del anillo DEKA (Figura 23 B). Las soluciones de menor energía libre de unión en canal nativo y el mutante F1579A se muestran en la Figura 23 C y D. En el caso de la mutante ambos tipos de interacciones no covalentes se pierden y el grupo piperazina se desplaza de ruta de permeabilidad.

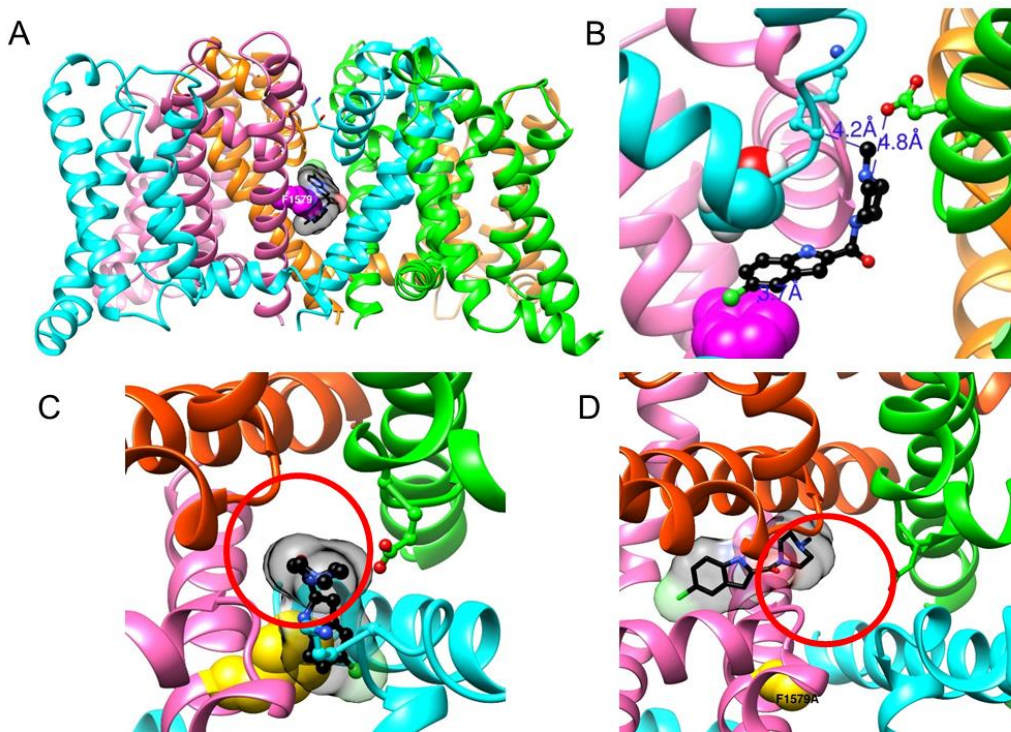


Figura 23. *Docking* de JNJ777120 en el canal de sodio Nav1.4. A: Se muestra la solución de menor energía (-7.3kcal) con el protocolo de *Blind docking* (estado de protonación N2H del fármaco), la fenilalanina del sitio de unión a anestésicos locales (F1579) se muestra en magenta. B: Se muestra un acercamiento de la unión más estable de JNJ777120 en el sitio de unión en donde se aprecia que el grupo amina de éste interactúa con el glutamato del anillo DEKA y se encuentra próximo a la lisina del filtro de selectividad, mientras que su grupo indol se ancla a una cavidad hidrófoba constituida por la F1579 y una treonina del dominio DIII (ambos en representación de radios de Van der Waals). C: Vista superior (extracelular) de B, el círculo rojo delimita el filtro de selectividad y en color dorado se muestra F1579. Se observa que JNJ777120 ocluye el poro del canal. D: Vista superior del modelo mutante del sitio de anestésicos locales F1579A, el círculo rojo delimita el filtro de selectividad y en dorado la alanina. Se observa que JNJ777120 en el mutante, ocluye en menor medida el canal. En todas las figuras el color naranja representa el dominio DI, en verde el dominio DII, en cian el DIII y en rosa el dominio DIV.

Discusión

Los resultados indican que JNJ7777120 ejerce un efecto en el canal de sodio $Na_v1.4$. En la relación corriente-voltaje (Figura 10) se aprecia que, a una concentración de $16\mu\text{M}$ (17% de bloqueo) se desplazó el potencial al que se observa el pico de corriente máximo en 5 mV a voltajes despolarizantes en el 80% de los casos (datos no mostrados). Además de que a partir de -15 mV se registra una mayor corriente en presencia del fármaco lo cual indica que su efecto es dependiente de voltaje. El fármaco altera la activación, al generar un desplazamiento significativo de la curva de conductancia hacia potenciales despolarizantes (Figura 11), modificando significativamente tanto en el voltaje medio como en la pendiente m , estos cambios concuerdan con la gráfica de la relación corriente contra voltaje. Contrariamente, los anestésicos locales no modifican la curva de conductancia del canal de sodio. Para explicar esto, se especulaba que el anillo aromático de los anestésicos locales podría interactuar con una región hidrófoba en la vía de conducción del sodio y al mismo tiempo, ocluyendo el poro del canal (Wang, 1990).

En la curva de inactivación de estado estable (Figura 11) se observa que en presencia de JNJ7777120 no hubo un cambio estadísticamente significativo en el voltaje medio, sin embargo, la pendiente k si cambió significativamente (de 3.83 ± 0.07 a 4.42 ± 0.08). De acuerdo con Fozzard, los anestésicos locales desplazan esta curva a voltajes hiperpolarizantes, sin modificar la pendiente k (Fozzard et al., 2011; Tikhonov, 2017). Con ello indicando que JNJ7777120 no muestra una de las principales características de los anestésicos locales.

Por otra parte, la cinética de inactivación de la corriente (Figura 12), en todos los casos se ajustó a una ecuación monoexponencial. El fármaco enlenteció este comportamiento en el intervalo de -35 a -15 mV, excepto al voltaje de -25 mV, en el cual hubo una aceleración significativa. Mientras tanto, la recuperación de la inactivación (Figura 13) en presencia de JNJ7777120 no tuvo un cambio significativo y al realizar el ajuste a una curva doble exponencial para obtener los valores de recuperación rápida y lenta, se observó que no hay cambios en ninguna de las dos constantes de tiempo. Una propiedad fundamental de los anestésicos locales (y de fármacos considerados anti-arrítmicos), es la acumulación de bloqueo cuando se realizan pruebas repetitivas de despolarización; propiedad denominada "dependencia de uso y frecuencia" (Becker & Reed,

2006; Fozzard et al., 2011). Dado que no hubo cambios en la inactivación de estado estable (Figura 11) ni en la recuperación de la inactivación, estos resultados nos indicaban que era baja la posibilidad de que los canales acumularan inactivación en presencia de JNJ7777120, y se corroboró al realizar los protocolos de frecuencia (Figura 14) al no observarse un bloqueo dependiente del uso y frecuencia. En conjunto, estos resultados sugieren que JNJ7777120 no presenta un bloqueo fásico y a diferencia de los anestésicos locales, no tiene una preferencia por los canales de sodio en estado inactivado, sino por los canales en estado abierto.

Los anestésicos locales se unen al canal en una cavidad hidrófoba ubicada entre el segmento S6 del dominio IV (DIVS6) y entre el segmento S6 del dominio DIII (DIIS6), conocida como el sitio de unión a anestésicos locales. Este sitio está conformado por los siguientes aminoácidos (en Nav1.4): la fenilalanina 1579 del DIVS6, la leucina 1280 DIIS6, la tirosina 1586 del DIVS6 y asparagina del DIS6, siendo el principal aminoácido la fenilalanina (Lipkin & Fozzard, 2005; Sunami & Fozzard, 2004). El segmento DIVS6 es fundamental para el bloqueo del canal de sodio y la afinidad por el estado inactivado del canal. El resto de los dominios no contribuyen significativamente en el bloqueo del canal, sin embargo, están involucrados en la dependencia del voltaje (en Nav1.2: la N418 del DIS6 y la L975 DIIS6) y en el cambio en la curva de inactivación de estado estable (en Nav1.2: la V424 del DIS6 y L983 del DIIS6) a voltajes hiperpolarizantes (Yarov-Yarovoy, 2001; Yaroy-Yarovoy, 2002).

Debido a la similitud de JNJ7777120 con los anestésicos locales al compartir una estructura química en común (un anillo aromático y una amina unidos por una cadena intermedia) se utilizó la mutante del sitio de unión de anestésicos locales (F1579A) y se esperaba observar una reducción significativa del efecto de JNJ7777120. En la curva I-V del mutante (Figura 16), no hay diferencias significativas, y se aprecia que hay una tendencia a una mayor activación de canales en presencia de JNJ7777120 que en la condición control, además, de un aumento de la corriente máxima en un 5% que no es significativo.

Estudios con lidocaína, benzocaína, mexiletina muestran que al mutar la fenilalanina (F1579A) se pierde el efecto bloqueador de estos fármacos, y se mantiene el desplazamiento de la curva de inactivación de estado estable a valores hiperpolarizantes, sin modificar la pendiente (Martinez-

Morales, 2008). En canal mutante (F1579A) en presencia de JNJ7777120 se observa un desplazamiento significativo en el voltaje medio de la curva de inactivación de estado estable a valores hiperpolarizantes (Figura 17) y no se observan cambios significativos en el valor de la pendiente, este efecto es similar al de los anestésicos locales (Fozzard et al., 2011; Martínez-Morales, 2008; Tikhonov, 2017). Se observó un enlentecimiento en la τ de inactivación (Figura 18) a los voltajes de -25 y -20 mV. De la misma forma, no se observa una modificación en la recuperación de la inactivación rápida ni de la lenta del canal de sodio rNav1.4, por lo que no hay cambios significativos en F1579A (Figura 19). Tampoco se observó una mayor acumulación en los protocolos de uso y frecuencia (Figura 20).

En el modelo sintópico si dos fármacos se unen al mismo sitio en un receptor para ejercer su efecto, la coaplicación daría lugar a una unión competitiva. En el modelo alotópico, cuando el resultado es un efecto menor al esperado, los fármacos poseen sitios diferentes de unión (Jarvis & Thompson, 2013). En nuestro caso los datos concuerdan con el modelo sintópico debido a que no hay diferencias en el bloqueo del canal cuando se administra primero lidocaína y posteriormente JNJ7777120. Estos experimentos indican que la unión de JNJ7777120 con el canal de sodio es obstaculizada cuando lidocaína previamente ha ocupado el sitio de unión. La interpretación de esto es que el fármaco se une al mismo sitio que lidocaína (Jo & Bean, 2017). Además, se realizó un segundo experimento de coaplicación para observar si había alguna diferencia si se aplicaba primero JNJ7777120 y luego lidocaína. El hecho de que el aumento del bloqueo ante esta coaplicación fuese significativo con respecto al bloqueo de la JNJ7777120 por sí sola, sin alcanzar al bloqueo de la coaplicación previa, apoya la hipótesis de una unión competitiva, sugiriendo que lidocaína desplaza a JNJ7777120 del sitio de unión a anestésicos locales.

Los resultados de *docking* indican que JNJ7777120 se une al sitio de unión a anestésicos locales, sin embargo, un 30% de las soluciones ubican al ligando en otros dos posibles sitios de unión con una mayor energía libre (-7 a -6.7 kcal/mol), es decir, con una menor afinidad relativa. Es posible que la modulación de la cinética de inactivación, la cual es significativa en los canales nativos y mutantes esté mediada por alguno de estos sitios de unión alternativos.

Los experimentos realizados en este trabajo demuestran que JNJ7777120 se está uniendo al sitio de unión a anestésicos locales y muestran por primera vez la interacción de JNJ7777120 con un canal iónico. Ya se ha reportado que diversos fármacos antiarrítmicos, anticonvulsivos, quininas y antimaláricos poseen la capacidad de bloquear al canal de sodio ocupando el sitio de unión a anestésicos locales y muestran diversos efectos en el canal de sodio (Fozzard *et al.*, 2011; Tikhonov, 2017). Sin embargo, no está completamente claro el mecanismo de bloqueo que subyace a la diversidad de efectos que se presentan (Tikhonov, 2017). Un fármaco puede ocupar el sitio de unión anestésicos locales y no presentar bloqueo dependiente de frecuencia, como en el caso de mefloquina en canales $Na_v1.4$ (Paiz-Candia *et al.*, 2017), cuyo anclaje molecular *in silico* coincide con el de JNJ7777120, en tanto que el anillo aromático interactúa con F1579 y el grupo catiónico se aproxima a la vía de conducción. Tikhonov en 2017 propone un modelo *in silico* de la unión de este tipo de bloqueadores de canal de sodio, en el que el grupo catiónico de éstos, puede interactuar con un ion sodio próximo al filtro de selectividad y de esta manera generar un bloqueo electrostático o estérico (Tikhonov, 2017).

Entre las características químicas de los anestésicos locales se encuentra que son moléculas liposolubles y un $pK_a > 7.4$ (Becker & Reed, 2006). En el modelo de Lipkind-Fozzard, los anestésicos locales poseen un grupo alquilamina que puede interactuar con la fenilalanina del sitio de unión a anestésicos locales (Fozzard *et al.*, 2011; Lipkind & Fozzard, 2006). En el caso de JNJ7777120 presenta un grupo metilamina (en el grupo piperazina), el cual, de acuerdo a las simulaciones puede interactuar electrostáticamente con el glutamato del filtro de selectividad (Figura 23). Este fármaco es liposoluble con una solubilidad de $\log S = -3.421$ y tiene un pK_a de 6.83. En la Figura 4 se muestran las microespecies de JNJ7777120 al pH de 7.6 (Chemicalize.com, 2017; Jójárt *et al.*, 2008), que fue al pH en que se ajustaron las soluciones. Se observa que el 85.4% del fármaco se encuentra en su forma no protonada mientras que el 14.6% se encuentra en su estado ionizado (Chemicalize.com, 2017). La forma no ionizada es importante ya que es la que atraviesa la membrana celular y no la forma protonada. A pesar de que JNJ7777120 a un pH de 7.6 es más liposoluble que lidocaína, la proporción de moléculas que se encuentran en su forma protonada es baja y esto podría explicar el bajo efecto bloqueador, debido a que la forma ionizada es la que muy probablemente interacciona con el sitio de unión a anestésicos locales.

De acuerdo con los resultados discutidos anteriormente, JNJ7777120 bloquea al canal de sodio $rNa_v1.4$ a través del sitio de unión a anestésicos locales, sin embargo, no se comporta de manera canónica como un anestésico local.

Conclusiones

- JNJ77771220 induce un bloqueo tónico en canales de sodio $rNa_v1.4 + \beta1$, mediado por la fenilalanina 1579 del sitio de unión a anestésicos locales, compitiendo con lidocaína.
- El bloqueo de JNJ77771220 es dependiente de voltaje e independiente de la concentración, con una EC_{50} de $16 \mu M$, un número de Hill de 1.20 ± 0.08 y un bloqueo máximo de 35% a una concentración de $100 \mu M$.
- JNJ77771220 modifica el voltaje medio y la pendiente de la conductancia del canal $rNa_v1.4$ a valores despolarizantes.
- JNJ77771220 modifica la pendiente de la curva de inactivación de estado estable sin afectar el voltaje medio.
- JNJ77771220 modula la cinética de inactivación, sin modificar la cinética de recuperación de la inactivación.
- JNJ77771220 no presenta bloqueo dependiente de frecuencia (a 1, 2, 5 Hz)
- En conjunto los resultados indican que JNJ77771220 no se comporta como un anestésico, al no tener preferencia por el estado inactivado del canal.

Bibliografía

Armstrong, C., & Hille, B. (1998). Voltage- Gated ion channels and electrical excitability. *Neuron.*, 20:371-380.

Barchi, R. (1983). Protein components of the purified sodium channel form rat skeletal sarcolemma. *J. Neurochem.*, 36:1377-1385.

Becker, D.E.; Reed, K.L. (2006). Essentials of local Anesthetic Pharmacology. *Anesth Prog* 53:98-109.

Butterworth, J., & Oxford, G. (2009). Local Anesthetics: A New Hydrophilic Pathway for Drug-receptor Reaction. *Anesthesiology*, 111:12-14.

Butterworth, J., & Strichartz, G. (1990). Molecular mechanisms of local anesthesia: A review. *Anesthesiology.*, 72:711-734.

Carmeliet, E., & Mubawa, K. (1998). Antiarrhythmic drugs and cardiac ion channels: mechanism of action. *Pro. Bio. Mol.*, 70:1-72.

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

Caterall, W. A. (2012). Voltage-Gated Sodium Channels at 60: Structure, Function, and Pathophysiology. *J. Physiology*, 590:2577-2589.

Catterall, W. A., & Mackie, K. (2012). Anestésicos locales. In L. L. Brunton (Ed.), *Goodman & Hilman's Las bases farmacológicas de la terapéutica* (pp. 565-582). México: McGraw Hill.

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-. *Pharmacol Rev.*, 57:397-409.

Chemicalize.com. (2017). Chemicalize - Instant Cheminformatics Solutions. [En línea] Disponible en: <https://chemicalize.com/#/calculation> [Acceso 16 de mayo de 2017].

- Cogé, F., & Guénin, S. (2001). Structure and expression of the human histamine H4-receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 8(284):301-309.
- Connelly, W., & Shenton, F. (2009). The histamine H4 receptor is functionally expressed on neurons in the mammalian CNS. *Br. J. Pharmacol.*, 157:55-63.
- Coruzzi, G. (2007). Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the selective histamine H4-receptor antagonists JNJ7777120 and VUF6002 in a rat model of carrageenan-induced acute inflammation. *European Journal of Pharmacology.*, 240-244.
- Courtney, K., & Strichartz, G. (1987). Structural elements which determine local anesthetic activity. In G. Strichartz, *Local Anesthetics*. (pp. 53-94). Berlin: Springer-Verlag.
- Dumont, J. (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morph.*, 136:153-180.
- Dunford, P. J. (2007). Histamine H4 receptor antagonists are superior to traditional antihistamines in the attenuation of experimental pruritus. *J Allergy Clin Immunol.*, 119(1):176-183.
- Escayg, A., & Goldin, A. L. (2010). Sodium channel SCN1A and epilepsy: Mutations and mechanism. *Epilepsia*, 51(9):1650–1658.
- Featherstone, D.E; Fujimoto, E. & Ruben, P.C. (1998) A defect in skeletal muscle sodium channel deactivation exacerbates hyperexcitability in human paramyotonia congenita. *Journal of Physiology*, 1:506(3):627-638.
- Fozzard, H., & Hanck, D. (1996). Structure and Function of Voltage -Dependent Sodium Channels: comparison of brain II and cardiac isoforms. *Physiol. Rev.*, 76: 887-926.
- Fozzard, H.A.; Sheets, M.F. y Hanck, D.A. (2011). The Sodium Channel as a Target for Local Anesthetic Drugs. *Frontiers in Pharmacology*. 2:68
- Goldin, A. L. (1999). Diversity of mammalian voltage-gated sodium channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 868:38-50.

Goldin, A. L.; Barchi, R. L.; Caldwell, J. H.; Hofmann, F.; Howe, J. R.; Hunter, J. C.; Kallen, R. G.; Mandel, G.; Meisler, M. H.; Netter, Y. B.; Noda, M.; Tamkun, M. M.; Waxman, S. G.; Wood, J. N.; Catterall, W. A. (2000). Nomenclature of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron*. 28:365-368.

Goldin, A. L. (2001). Resurgence of sodium channel research. *Annu. Rev. Physiol.*, 63:871-894.

Hartshorne, R., & al., e. (1982). The saxitoxin receptor of the sodium channel from rat brain: evidence for two nonidentical beta subunits. *J. Biol. Chem.* , 257:13888-13891.

Heinemann, S.H.; Terlau, H.; Stuhmer, W; Imoto, K; Numa, S. (1992). Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature*, 356(6368):441-443

Hille, B. (2001). Ionic channels and pores. En *Ionic Channels of excitable membranes*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.

Hodgkin, A., & Huxley, A. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Gen. Physiol.*, 117:500-544.

Hsieh, G. C. (2010). H4 receptor antagonism exhibits anti-nociceptive effects in inflammatory and neuropathic pain models in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 95:41-50.

Isom, L. (2001). Sodium Channel β subunits: Anything but auxiliary. *The Neuroscientist.*, 7(1):42-54.

Isom, L., & al., e. (1992). Primary structure and functional expression of the β 1-subunit of the rat brain sodium channel. *Science.*, 256:839-842.

Isom, L., & Ragsdale, D. (1995). Structure and function of the β 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell.*, 3;83(3):433-442.

Jarvis, G.E.; Thompson, A.J. (2013). A golden approach to ion channel inhibition. *Cell Press*. 34,9:481-488.

Jo, S. & Bean, B.P. (2017). Lacosamide inhibition of Nav1.7 voltage-gated sodium channels: slow binding to fast-inactivated states. *Molecular Pharmacology* 91(4):277-286.

Jójárt, B.; Kiss, R.; Viskolez, B. & Keserú, G.M. (2008). Activation Mechanism of the Human Histamine H4 Receptor - An Explicit Membrane Molecular Dynamics Simulation Study. *J. Chem. Inf. Model.* 48: 1199-1210.

Kaplan MR, C., & al., e. (2001). Differential control of clustering of the sodium channels Nav1.2 and Nav 1.6 at developing CNS nodes of Ranvier. *Neuron*, 30:105–119.

Katz, A. M. (2006). *Physiology of the Heart*. (P. M. Spooner, & A. M., Eds.) Philadelphia, PA.: Lippincott Williams & Wilkins.

Krafte, D. (1991). Expression of cardiac Na channels with appropriated physiological and pharmacological properties in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88:4071-4074.

Lehmann-Horn, Frank; Jurkat-Rott. (1999). Voltage-Gated Ion Channels and Hereditary Disease. *Physiological Reviews*, 79(4):1317-1372.

Levinson, S.R. (2017). Functional Architecture of an Ion Channel. [Imagen]. Recuperado de: <http://www.ucdenver.edu/academics/colleges/medicalschoo/departments/physiology/faculty/Pages/Levinson.aspx> [Acceso: 9 de enero de 2017].

Lipkind G.M. & Fozzard, H. A. (2005). Molecular modeling of local anesthetic drug binding by voltage-gated sodium channels. *Mol. Pharmacol.* 68, 1611–1622

Lipkind G.M. & Fozzard H.A. (2008). Voltage-gated Na channel selectivity: the role of the conserved domain III lysine residue. *J Gen Physiol.* 131(6):523–529

Liu, C., & Ma, X.J. (2001). Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H4) expressed in bone marrow. *Mol. Pharmacol.*, 59:420-426.

Lucas, P.T.; Meadows, L.S.; Nicholls, J.; Ragsdale, D.S. (2005). An epilepsy mutation in the beta1 subunit of the voltage-gated sodium channel results in reduced channel sensitivity to phenytoin. *Epilepsy Res* 64(3):77-84.

Mantengazza, M., & al., e. (2010). Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders. *Lancet Neurol.*, 9(4):413-24.

Martínez-Morales, E. (2008). Efectos de mexiletina, lidocaína, y benzocaína sobre el canal de sodio de músculo esquelético Nav1.4, expresado en ovocitos de la rana *Xenopus laevis* (Tesis de maestría). Instituto de Fisiología, BUAP, Puebla, Puebla.

Messner, D., & Catterall, W. (1985). The sodium channel from rat brain. Separation and characterization of subunits. *J. Biol. Chem.*, 260:10596-10604.

Methfessel, C., & al., e. (1986). Patch clamp measurements on *Xenopus laevis* oocytes: currents through endogenous channels and implanted acetylcholine receptor and sodium channels. *Pflügers Archiv.*, 407:577-588.

Murdoch, R. J., & Greene, N. M. (1981). Anestésicos locales. In A. Goodman Gilman, L. S. Goodman, & A. Gilman, Goodman y Gilman, Las bases farmacológicas de la terapéuticas (pp. 306-325). Mexico: Panamericana.

Narahashi, T., & Frazier, D. (1971). Site of action and active form of local anesthetics. *Neurosci. Res.*, 4:65-99.

Nuss, H., & al., e. (1995). Functional association of the $\beta 1$ subunit with human cardiac (hH1) and rat skeletal muscle ($\beta 1$) sodium channel β subunits expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Gen. Physiol.*, 106:1171-1191.

Oda, T., & Morikawa, N. (2000). Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. *J. Biol. Chem.*, 275:36781-36786.

Olschewski, A.; Hempelmann, G.; Vogel, W. y Safronov, B.V. (1998). Blockade of Na⁺ and K⁺ currents by local anesthetics in the dorsal horn neurons of the spinal cord. *Anesthesiology*. 1;88(1):172-179.

O'Reilly, A. O., & al., e. (2012). Bisphenol A binds to the local anesthetic receptor site to block the human cardiac sodium channel. *PLoS One*, 7(7): e41667.

Paiz-Candia, B.; Islas, A.A.; Sánchez-Solano, A.; Mancilla-Simbro, C.; Scior, T.; Millan-PerezPeña & Salinas-Stefanón, E.M. (2017). Mefloquine inhibits voltage dependent Nav1.4 channel by overlapping the local anaesthetic binding site. *European Journal of Pharmacology*. 79: 215-223.

Peters, C. H. & Ruben, P. C. (2014). Introduction to Sodium Channels. En Ruben, P. C. (Ed.). Voltage Gated Sodium Channels (pp. 2 -5). W. Rosenthal, Berlin. Springer.

Ragsdale, D., & McPhee, J. (1994). Molecular determinants of state-dependent block of Na⁺ channels by local anesthetics. *Science.*, 265:1724-1728.

Richard, J. P. (1991). Kinetic parameters for the elimination reaction catalyzed by triosephosphate isomerase and an estimation of the reaction's physiological significance. *Biochemistry.*, 30:4581-4585.

Ritchie, J. G. (1966). On the mode of action of local anesthetics. *Annu. Rev. Pharmacol.*, 6:405-430.

Roberts, R., & Barchi, R. (1987). The voltage-sensitive sodium channel from rabbit skeletal muscle: Chemical characterization of subunits. *J. Biol. Chem.*, 262:2298-2303.

Savio-Galimberti, E. (2012). Voltage-gated sodium channels: biophysics, pharmacology, and related channelopathies. *Front. Pharmacol.*, 3:124.

Smith, D., & Peterson, M. (1999). Local anesthesia. Topical application, local infiltration, and field block. *Postgrad. Med.*, 106 (2): 57-66.

Smith, R., & Goldin, A. (1998). Functional analysis of the rat I sodium channel in *Xenopus* oocytes. *J. Neurosci.*, 18:811-820.

Strichartz, G., & Ritchie, J. (1987). The action of local anesthetics on ion channels of excitable tissues. In G. Strichartz, *Local Anesthetics* (pp. 21-53). Berlin: Springer-Verlag.

Tan, J.; Choi, J.S.; Soderlund, D.M. (2011). Coexpression with Auxiliary β Subunits Modulates the Action of Tefluthrin on Rat Na(v)1.6 and Na(v)1.3 Sodium Channels. *Pestic Biochem Physiol* 101(3):256-264.

Tikhonov, D.B.; Zhorov, B. S. (2017). Mechanism of sodium channel block by local anesthetics, antiarrhythmics, and anticonvulsants. *The Journal of General Physiology*, 149(4):465-481

Thurmond, R.L. (2003). The first potent and selective non-imidazole human histamine H4 receptor antagonist. *J. Med. Chem.*, 46(19):3957-3960.

Thurmond, R.L. (2004). A potent and Selective Histamine H4 Receptor Antagonist with Anti-Inflammatory Properties. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 309:404-413.

Trott, O. & Olson, A.J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J Comput Chem.* 30;31(2): 455-461.

Uebachs, M.; Albus, C; Opitz, T.; Isom, L.; Niespodziany, I.; Wolff, C.; Beck, H. (2012). Loss of β 1 accessory Na⁺ channel subunits causes failure of carbamazepine, but not of lacosamide, in blocking high-frequency firing via differential effects on persistent Na⁺ currents. *Epilepsia.* 53(11):1959-67.

Uebachs, M.; Opitz, T.; Royeck, M.; Dickhof, G.; Horstmann, M.T.; Isom, L.L.; Beck, H. (2010). Efficacy loss of the anticonvulsant carbamazepine in mice lacking sodium channel beta subunits via paradoxical effects on persistent sodium currents. *J Neurosci* 30(25):8489-501.

Varga, C. (2005). Inhibitory effects of histamine H4 receptor antagonists on experimental colitis in the rat. *European Journal of Pharmacology.*, 130-138.

Yarov-Yarovoy, V., & McPhee, J. (2002). Role of amino acid residues in transmembrane segments IS6 and IIS6 of the sodium channel α subunit in voltage-dependent gating and drug block. *J. Biol. Chem.*, 277:35393-35401.

Wang, D.W.; Crotti, L.; Shimizu, W.; Pedrazzini, M.; Cantu, F.; De-Filippo, P.; Kishiki, K.; Miyazaki, A; Ikeda, T.; Schwartz, P.J. & George, A.L. (2008) Malignant Perinatal Variant of Long-QT Syndrome Caused by a Profoundly Dysfunctional Cardiac Sodium Channel. *Cir Arrhythm Electrophysiol.* 1(5): 370-378.

Wang, G.K. (1990). Binding Affinity and Stereoselectivity of Local Anesthetics in Single Batrachotoxin-activated Na⁺ Channels. *Journal of General Physiology.* 96: 1105-1127.

Wang, G.K. & Strichartz, G.R. (2012). State-Dependent Inhibition of Sodium Channels by Local Anesthetics: A 40-Year Evolution. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. 6; 2:120-127.

Yarov-Yarovoy, V.; Brown, J.; Sharp, E.M; Clares, J.J.; Scheuer, T. & Catterall, W.A. (2001). Molecular Determinants of Voltage-dependent Gating and Binding of Pore-blocking Drugs in Transmembrane Segment IIS6 of the Na Channel α Subunit. *The Journal of Biological Chemistry*. 276, 1: 20-27.

Yarov-Yarovoy, V.; McPhee, J.C.; Idsvoog, D.; Pate, C.; Scheuer, T. & Catterall, W.A. (2001). Role of Amino Acid Residues in Transmembrane Segments IS6 and IIS6 of the Na Channel α Subunit in Voltage-dependent Gating and Drug Block. *The Journal of Biological Chemistry*. 276, 38: 35393-35401.