



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

---



INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA

LABORATORIO DE BIOFÍSICA CARDIACA

MAESTRÍA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

**“Efectos electrofisiológicos del  
 $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol en los canales de sodio dependientes de  
voltaje  $hNa_v1.5$  expresados en ovocitos de rana *Xenopus laevis*”**

Junio 2023

**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**LFT. Ricardo Vázquez Cabrera**

Director de tesis:

Dr. Eduardo Marcos Salinas Stefanon

Asesores:

Dra. María del Rosario Guadalupe Vega y Sáenz de Miera

Dr. José Everardo Avelino Cruz

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	III
ÍNDICE DE GRÁFICAS .....	III
ÍNDICE DE TABLAS .....	IV
ABREVIATURAS.....	V
RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	3
ANTECEDENTES .....	7
Antecedentes Generales.....	7
Canales de sodio dependientes de voltaje .....	7
Hipótesis de Sodio de Hodgkin, Huxley y Katz .....	12
Potencial de acción cardiaco .....	13
El canal hNav1.5 y la corriente $I_{Na}$ .....	16
Sistema endocannabinoide.....	18
Receptores cannabinoides .....	18
Receptor CB <sub>1</sub> .....	18
Receptor CB <sub>2</sub> .....	20
Otros receptores para cannabinoides .....	21
Sustancias cannabinoides y endocannabinoides .....	22
Anandamida.....	24
Antecedentes Específicos .....	25
JUSTIFICACIÓN .....	28
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	28
HIPÓTESIS CIENTÍFICA .....	29
OBJETIVOS .....	29
Objetivo General .....	29
Objetivos Específicos.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS .....	30
Descripción General.....	30
Técnicas y Procedimientos .....	30
Amplificación y purificación del ADNc del canal hNav1.5 .....	30

Preparación del medio LB.....	30
Precultivo .....	31
Cultivo Masivo .....	31
Purificación del ADNc .....	31
Comprobación del ADNc y determinación de la concentración .....	32
Fármacos y Soluciones.....	33
Fármacos.....	33
Soluciones .....	33
Metodología para la obtención de ovocitos.....	33
Modelo.....	33
Anestesia .....	34
Cirugía .....	34
Proceso Enzimático .....	35
Selección de ovocitos .....	35
Metodología para la expresión heteróloga del hNav1.5.....	35
Inyección de ovocitos.....	35
Metodología del registro electrofisiológico .....	36
Criterios de inclusión y exclusión.....	36
Aplicación de THC .....	37
Protocolos Experimentales .....	37
Protocolo I. Relación Corriente - Voltaje (IV) .....	37
Protocolo II. Inactivación de estado estable.....	38
Protocolo IV. Recuperación de la inactivación .....	39
Protocolo V. Dependencia de uso y frecuencia .....	40
Protocolo VI. Curso Temporal.....	41
Análisis estadístico.....	41
Bioética .....	42
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>43</b>
Bloqueo dependiente de concentración .....	43
Relación Corriente contra voltaje .....	46
Dependencia de voltaje.....	47
Inactivación de estado estable y conductancia .....	48

Cinética de activación .....	50
Cinética de inactivación .....	51
Curso temporal de la recuperación de la inactivación.....	52
Bloqueo dependiente de uso y frecuencia .....	53
Curso temporal de la inhibición de la corriente de sodio.....	54
DISCUSIÓN .....	56
CONCLUSIONES.....	61
REFERENCIAS.....	62
ANEXOS .....	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Dominio Formador de Poro (PD) y Dominio Sensor de Voltaje (VSD) de la subunidad $\alpha$ del $\text{Na}_v$ .....	7
Figura 2: Árbol filogenético de los canales de sodio dependientes de voltaje.....	9
Figura 3: Diferentes formas de potencial de acción en células cardiacas .....	15
Figura 4: Diferencias biofísicas entre la $\text{I}_{\text{Na}^+}$ cardiaca y neuronal.....	17
Figura 5: Estructura del receptor $\text{CB}_1$ .....	20
Figura 6: Estructura del canal PPAR.....	22
Figura 7: Mapeo de los tipos celulares del corazón .....	25
Figura 8: Efecto inhibitorio del AEA en el pico de la corriente de entrada de $\text{Na}^+$ .	27
Figura 9: Mapa de restricción del $\text{hNav1.5}$ cortado con la enzima BamHI.....	70

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1: Relación corriente contra voltaje del canal $\text{hNav1.5}$ .....	44
Gráfica 2: Efecto en el pico de la corriente de sodio en función de la concentración de THC.....	45
Gráfica 3: Curva dosis - efecto .....	45
Gráfica 4: Relación corriente contra voltaje del canal de $\text{hNav1.5}$ .....	46
Gráfica 5. Bloqueo dependiente de voltaje.....	47
Gráfica 6. Curva de inactivación de estado estable y conductancia del $\text{hNav1.5}$ ..	49

Gráfica 7. Cinética de activación del canal hNav1.5 .....	50
Gráfica 8. Cinética de inactivación .....	51
Gráfica 9. Curso temporal de la recuperación de la inactivación.....	52
Gráfica 10. Bloqueo dependiente de uso y frecuencia .....	54
Gráfica 11. Curso temporal de la instalación y disociación del THC .....	55

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Expresión, isoformas y efectos clínicos de los Nav.....	12
Tabla 2: Efectos fisiológicos del THC.....	24
Tabla 3. Porcentaje de bloqueo en relación con la concentración de THC .....	43
Tabla 4. Parámetros de inactivación de estado estable y conductancia del canal hNav1.5 .....	49
Tabla 5. Recuperación de la inactivación.....	53

## ABREVIATURAS

$\mu\text{A}$	Microamperios
$\mu\text{l}$	Microlitros
$\mu\text{M}$	Micromolar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AEA	Anandamida o araquidonil etanolamida
AMPc	Adenosina-3', 5' monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CB <sub>1</sub>	Receptor para sustancias cannabinoides tipo 1
CB <sub>2</sub>	Receptor para sustancias cannabinoides tipo 2
CBD	Cannabidiol
CBs	Sustancias cannabinoides
CHO	Células de ovario de hámster chino
DEKA	Anillo del filtro de selectividad (aspartato, glutamato, lisina, alanina)
DFP	Dominio formador de poro
DI	Dominio 1
DII	Dominio 2
DIII	Dominio 3
DIV	Dominio 4
DSV	Dominio sensor de voltaje
eCBs	Sustancias endocannabinoides
$E_m$	Potencial de membrana
$E_{\text{Na}^+}$	Potencial de equilibrio para el ion sodio
$G_{\text{max}}$	Conductancia de membrana máxima
$G_{\text{Na}^+}$	Conductancia de membrana del ion sodio
GPCRs	Receptores acoplados a proteína G
HEK	Human Embryonic, Kidney
Hz	Hertz
$I_{\text{Na}^+}$	Corriente de sodio
kDa	kiloDaltons
$K_v$	Canal de potasio dependiente de voltaje
mg	Miligramos
min	Minutos
mM	Milimolar
ms	Milisegundos
mV	Milivolts

Nav	Canal de sodio dependiente de voltaje
PAC	Potencial de acción cardiaco
PPAR	Receptores activados por proliferadores peroxisomales
s	Segundos
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
THC	$\Delta^9$ -Tetrahidrocannabinol
TRPV1	Canales receptores de potenciales transitorios vaniloide tipo 1
TTX	Tetrodotoxina
$\alpha$	Subunidad alfa
$\beta$	Subunidad beta
$\tau$	Constante de tiempo

## RESUMEN

Los cannabinoides tienen propiedades inquietantes que desde hace mucho tiempo han sido objeto de interés y estudio debido a las manifestaciones clínicas y síntomas asociados con la exposición a estas sustancias; en este sentido, los efectos analgésicos alcanzados con estos compuestos, han despertado la iniciativa de investigar a los cannabinoides como opciones terapéuticas para el manejo del dolor, aunque no ha sido posible hasta el momento dilucidar por completo los mecanismos fisiológicos involucrados en este proceso. Además de esto, las sustancias cannabinoides han sido poco estudiadas en sus efectos fuera del sistema nervioso, una evidencia clara es la falta de basta información que relacione a esos compuestos con el sistema cardiovascular y específicamente con el corazón, un órgano que posee una importancia vital en cualquier ser vivo. Se piensa que los cannabinoides podrían modular la actividad cardiaca a través de los canales iónicos dependientes de voltaje y esta podría convertirse en una ventana terapéutica para alteraciones específicas de la actividad eléctrica del corazón.

En este trabajo de investigación se estudió el efecto del  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC), un fitocannabinoide aislado de las variedades de *Cannabis sativa* y cuyos efectos psicoactivos han sido ampliamente reconocidos. Sin embargo, en este caso la sustancia se hizo interactuar con el canal hNav1.5, un canal de sodio expresado casi únicamente en tejido cardiaco, el objetivo de este estudio fue describir los efectos electrofisiológicos de la sustancia sobre el canal. La isoforma hNav1.5 se expresó en ovocitos de rana *Xenopus laevis*, utilizando la técnica de expresión heteróloga de proteínas mediante la inyección nuclear con ADNc. Para los registros electrofisiológicos se utilizó la técnica de voltage-clamp de célula completa con dos microelectrodos.

En nuestros resultados se observó que el THC produce un bloqueo dependiente de concentración e independiente de voltaje; el THC desplaza el  $V_{1/2}$  de inactivación hacia potenciales de membrana hiperpolarizantes, pero no provoca

cambios significativos en la curva de conductancia. El THC modificó la cinética de activación e inactivación al acelerar las constantes de tiempo para estos procesos biofísicos. Se observó también un enlentecimiento significativo en la recuperación de la inactivación y un efecto prácticamente nulo en el bloqueo dependiente de uso y frecuencia. El tiempo de instalación del fármaco sugiere que el THC actúa atravesando la membrana plasmática. Hace falta más investigación para poder aproximar mejor los efectos del THC sobre los canales iónicos dependientes de voltaje y su influencia en el potencial de acción cardíaco.

## INTRODUCCIÓN

La marihuana es una de las drogas utilizadas con fines recreativos más consumida en la sociedad occidental, que se ha popularizado desde mediados del siglo XX, sobre todo en la población joven, debido a la capacidad que tiene de producir efectos de sedación, euforia, placer y alteración en la percepción de la realidad. La marihuana es un producto derivado de una especie herbácea denominada *Cannabis sativa*, una planta endémica del territorio asiático y que con aproximadamente 12 000 años, probablemente ha sido uno de los cultivos más antiguos en la historia de la humanidad (Clarke & Merlin, 2013), debido a su alta viabilidad y por su gran versatilidad de convertirse en productos comestibles, combustibles y textiles; sin embargo, autores dejan entrever que el consumo lúdico de estas sustancias ha sido uno de los fines con los cuales se ha cultivado esta planta desde tiempos ancestrales, pues ha sido notable la manipulación de las especies para que presenten mayor contenido de sustancias relacionadas con efectos psicoactivos (Russo et al., 2008).

Las primeras evidencias del uso medicinal de la *Cannabis sativa* se remontan a las primeras civilizaciones de la humanidad; en China cerca del año 2600 a.C. el cirujano de la dinastía Han, Huá Tuó, escribió un libro en donde se describían algunas recetas donde se evidenciaba el uso del cannabis como un elemento indispensable para provocar anestesia (Bai et al., 2021). Algunos papiros encontrados en Egipto que datan del año 1500 a.C., sugieren que el cannabis era aplicado de forma tópica para aliviar dolencias e incluso era prescrito como un tratamiento para la depresión. Más tarde en la historia y durante el imperio romano, se describieron algunas propiedades antiinflamatorias de la planta y se utilizó para tratar la inflamación de las articulaciones. Para el siglo XIX, el uso de la planta y sus derivados se extendió también por el continente europeo, siendo utilizado incluso por la reina Victoria. En 1878 Rusell Reynolds, un médico británico, reconoció como indispensable aislar los componentes activos de la planta con el fin de evitar los efectos adversos de la administración de cannabis, sin embargo, sus intentos fueron en vano. Debido a la descripción de múltiples

efectos no deseados e incluso intoxicación al consumir *Cannabis sativa*, sumado al descubrimiento de fármacos antiinflamatorios relativamente más seguros; para 1932, Gran Bretaña eliminó la utilización del cannabis como herramienta terapéutica y pocos años después, Estados Unidos de América retiró a las sustancias derivadas del cannabis de su farmacopea. La Organización de las Naciones Unidas, en el año 1961 colocó al cannabis y sus derivados en la lista IV de estupefacientes como una droga de régimen estricto junto con la heroína. La era dorada del cannabis terminó por completo en 1970 cuando Estados Unidos declaró a esta planta en la lista 1 de estupefacientes con una regulación estricta que prohibía la comercialización, transporte, portación, consumo e incluso la investigación con cannabinoides (Crocq, 2020).

La *Cannabis sativa* contiene más de 460 compuestos químicos, de los cuales al menos 100 son reconocidos como cannabinoides (según una estructura carbocíclica de 21 carbonos). En 1940 se aisló la primera sustancia cannabinoide, el cannabidiol (CBD) y en 1964 Mechoulam y Gaoni en Israel, aislaron al THC como el principal elemento psicoactivo de la planta (Burstein, 2015; Mechoulam & Gaoni, 1965); estos descubrimientos sentaron las bases para la investigación con cannabinoides y en 1988, Devane y colaboradores aislaron un receptor específico para esta sustancia en el cerebro de humanos y ratas, al que denominaron CB<sub>1</sub>R. Con sólo cuatro años de diferencia del descubrimiento del CB<sub>1</sub>R, fue posible identificar una sustancia endógena que activa los receptores CB, el araquidonil etanolamida o anandamida (AEA) (Devane et al., 1992), un hallazgo que demostró que los seres humanos hemos estado expuestos desde hace miles de años a los cannabinoides. En 1995, se aisló un segundo receptor para cannabinoides, denominado CB<sub>2</sub>, desde entonces se han descubierto un número significativo de moléculas que participan en un proceso de señalización endógena derivada de la exposición a cannabinoides, al que se le denominó “sistema endocannabinoide”; dicho sistema tiene presencia e influencia en muchos tejidos, órganos y sistemas corporales, aunque al sistema nervioso central (SNC) y al sistema nervioso periférico (SNP) se les ha dado mayor protagonismo (Joshi & Onaivi, 2019).

Muchos de los signos y síntomas manifestados por el consumo de sustancias cannabinoides son derivados de la activación de los receptores CB, considerados receptores metabotrópicos, cuya actividad es mediada por moléculas denominadas segundos mensajeros. Aunque se ha tratado de dilucidar los mecanismos específicos que podrían respaldar al uso terapéutico de los cannabinoides, se han encontrado algunos obstáculos que han enlentecido alcanzar dichos objetivos; a pesar de eso, en la actualidad se ha demostrado que así como los cannabinoides pueden activar receptores CB, también pueden interactuar y provocar respuestas específicas cuando se unen a otras estructuras proteicas como receptores TRPV, PPAR y canales iónicos activados por voltaje.

Los canales iónicos activados por voltaje son proteínas transmembrana que forman un canal continuo a través de la membrana plasmática, su principal función es permitir el paso de iones entre el interior y el exterior de la célula. Casi todos los canales iónicos tienen al menos 3 propiedades específicas: permeabilidad iónica, es decir, la capacidad de transportar iones; selectividad iónica, que le confiere a los canales la capacidad de conducir únicamente una especie de ion; y actividad dependiente de voltaje, en la que los cambios del potencial de membrana dictan el comportamiento del canal. Los canales iónicos son responsables de la actividad eléctrica en las células excitables y partícipes en el establecimiento y propagación de potenciales de acción; estos potenciales de acción están involucrados en múltiples respuestas celulares como la liberación de neurotransmisores, la contracción de células del tejido muscular o la propagación de información sensorial y motora en células nerviosas (de Lera Ruiz & Kraus, 2015).

En el corazón el potencial de acción cardiaco dicta la actividad rítmica de este órgano para que se contraiga de forma armónica y función de las exigencias de los demás tejidos, también tiene una importancia vital porque el corazón es responsable del bombeo de sangre hacia todos los tejidos que conforman un organismo. Cualquier alteración en los canales iónicos expresados en la membrana de los cardiomiocitos, se traduce en una alteración también del potencial de acción cardiaco y por lo tanto, en una actividad contráctil anormal.

Existen múltiples condiciones clínicas que pueden afectar la función de los canales iónicos y provocar lo que denominamos arritmias cardiacas (Detta, Frisso, & Salvatore, 2015).

Aunque en los cardiomiocitos se expresan múltiples canales iónicos dependientes de voltaje, con la capacidad de conducir diferentes especies de iones como sodio ( $\text{Na}^+$ ), calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), cloro ( $\text{Cl}^-$ ) y potasio ( $\text{K}^+$ ); se reconoce que todos son importantes para el correcto funcionamiento del corazón, sin embargo, en esta investigación nos enfocamos el canal de sodio activado por voltaje  $\text{Nav}1.5$  porque es el responsable del inicio del potencial de acción cardiaco y ha sido blanco terapéutico de muchas sustancias con efecto antiarrítmico.

Aunque en estudios previos se ha demostrado que las sustancias cannabinoides provocan una disminución de la corriente de sodio a través del  $\text{Nav}1.5$  (Ghovanloo et al., 2018), no se ha completado esa información con el estudio de todas las propiedades biofísicas del canal en presencia de esos compuestos, es por esa razón que se fundamenta esta investigación, intentando proveer nuevos elementos que propicien un mejor entendimiento de la fisiología del canal y posiblemente la visualización de los cannabinoides como herramientas terapéuticas en el abordaje de la patología cardiaca.

# ANTECEDENTES

## Antecedentes Generales

### Canales de sodio dependientes de voltaje

Los canales de sodio activados por voltaje ( $\text{Na}_v$ ) son proteínas transmembrana que tienen un rol importante en la actividad eléctrica de las células excitables. Las corrientes de sodio activadas por voltaje fueron descritas por primera vez por Hodgking y Huxley en 1952 cuando estudiaban las propiedades eléctricas del axón gigante de calamar (Moczydlowski, 2016). Los  $\text{Na}_v$  están involucrados en múltiples actividades celulares siendo la más reconocida la generación y propagación de potenciales de acción, que desencadenan procesos como la contracción en células musculares y la transferencia de información sensorial o motora en células nerviosas (de Lera Ruiz & Kraus, 2015). La arquitectura molecular de los  $\text{Na}_v$  está conformada por una subunidad  $\alpha$  (Figura 1), formadora de poro, de aproximadamente 2000 residuos de aminoácidos y una masa de alrededor de 250 KDa, unida a una o más subunidades  $\beta$ , que cumplen la función de regular la actividad de la subunidad  $\alpha$  (Catterall, Lenaeus, & Gamal El-Din, 2020; Xu et al., 2019).

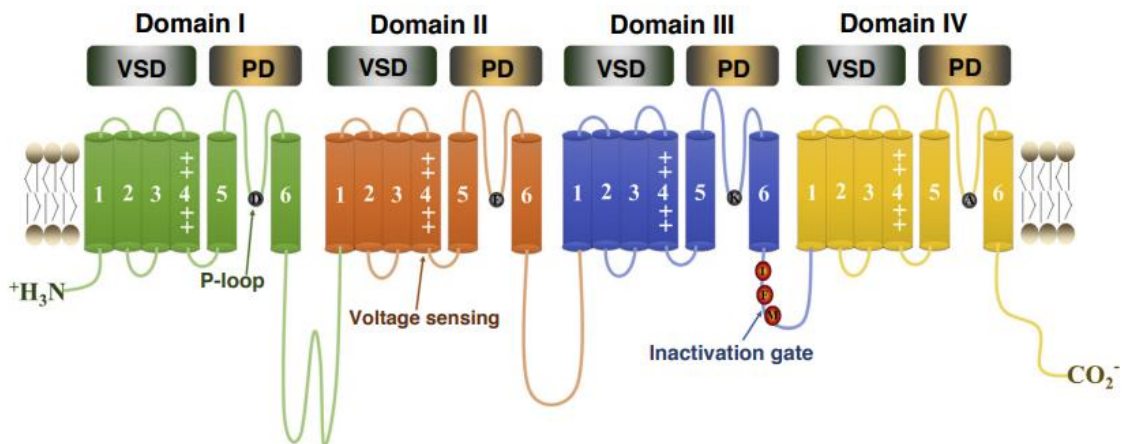


Figura 1: Dominio Formador de Poro (PD) y Dominio Sensor de Voltaje (VSD) de la subunidad  $\alpha$  del  $\text{Na}_v$ . Tomado de Xu et al., 2019.

La subunidad principal  $\alpha$ , consiste en un polipéptido que se pliega en forma de tetrámero con dominios homólogos (DI-DIV), donde cada dominio contiene seis segmentos transmembrana (S1-S6) unidos por asas mediante enlaces covalentes. Los extremos N y C de la proteína no presentan similitudes en su secuencia de aminoácidos (D. L. Bennett, Clark, Huang, Waxman, & Dib-Hajj, 2019). Aproximadamente la mitad de la proteína se encuentra en el compartimiento intracelular, un tercio de la estructura del canal está anclada a la membrana y un sexto está en el compartimiento extracelular (Hanck & Fozzard, 2007).

De momento se tienen identificadas nueve isoformas de la subunidad  $\alpha$  (Nav1.1-Nav1.9), codificadas por los genes SCN1A-SCN5A y SCN8A-SCN11A. Una forma de clasificar a las subunidades alfa es según la propiedad de ser bloqueadas por la tetrodotoxina. La tetrodotoxina (TTX) es una sustancia altamente tóxica sintetizada en los ovarios del pez globo, tiene la propiedad de bloquear los canales de sodio al unirse al filtro de selectividad de los  $\text{Nav}$ , impidiendo la conducción de iones de sodio y evitando la generación y propagación de potenciales de acción (Bane, Lehane, Dikshit, O'Riordan, & Furey, 2014). La resistencia a la TTX mostrada por los canales  $\text{Nav}$  1.5, 1.8 y 1.9, se debe a una sustitución con aminoácidos no aromáticos en el sitio 401 del asa del Dominio I, comparado con el resto de los canales que poseen un anillo aromático en ese sitio, este intercambio de aminoácidos reduce la sensibilidad a las concentraciones de TTX (Lee & Ruben, 2008). En la figura 2, se muestra el árbol filogenético de los  $\text{Nav}$  y sus características.

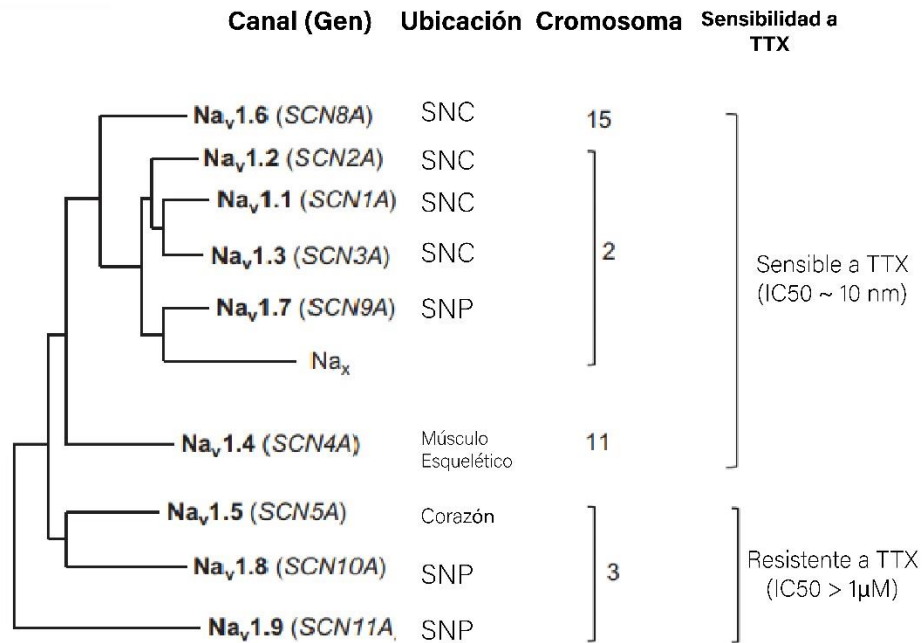


Figura 2: Árbol filogenético de los canales de sodio dependientes de voltaje, su distribución en el cuerpo humano, cromosoma que contiene al gen y sensibilidad a TTX. Sistema Nervioso Central (SNC), sistema nervioso periférico (SNP), tetrodotoxina (TTX). Modificado de Zimmer, T., Haufe, V., & Blechschmidt, S., 2014.

La subunidad  $\alpha$  morfológicamente y para su estudio, suele dividirse en dos regiones importantes, el dominio formador de poro y el dominio sensor de voltaje. La conformación del Dominio Formador del Poro (DFP), por donde se conducen los iones de sodio, está dada por los segmentos S5-S6 de cada uno de los cuatro dominios de la proteína y las asas que los conectan, mientras que el Dominio Sensor de Voltaje (DSV) está formado por las hélices S1-S4 de los cuatro dominios del tetrámero (Noreng, Li, & Payandeh, 2021). En el segmento S4 se encuentran residuos de arginina y lisina cargados positivamente, que le otorgan al canal, la capacidad de percibir cambios en el potencial de membrana. El DFP y el DSV se encuentran unidos por asas, de tal modo, que cuando la célula se despolariza, los segmentos S4 se mueven al espacio extracelular, el movimiento induce un cambio conformacional que abre el poro del canal (Pless et al., 2014).

Gracias a la clonación de los  $\text{Na}_v$  fue posible identificar que existe una región en todas las isoformas que está altamente conservada entre los segmentos S5-S6, que se pliegan en forma de anillo y a esta región se le atribuyó la selectividad del canal. Sin embargo, con el paso del tiempo se descubrió que a 3 o 4 residuos hacia el extremo C se encontraba otra región conservada de aminoácidos que formaban otro anillo conformado por carboxilatos-glutamato, glutamato, aspartato y aspartato que actualmente es conocido como vestíbulo externo del canal y corresponde al sitio de unión a la TTX, cuando se elimina el glutamato del vestíbulo externo, se pierde la afinidad del canal por la TTX (Choudhary, Yotsu-Yamashita, Shang, Yasumoto, & Dudley, 2003; Moczydlowski, 2013). La isoforma  $\text{Na}_v1.5$  se asocia con una resistencia a la TTX por la sustitución en el DI del vestíbulo externo de aspartato por cisteína (Jiang et al., 2020).

Los iones de sodio ( $\text{Na}^+$ ) y potasio ( $\text{K}^+$ ) tienen un radio de 0.95 y 1.33 Å, tienen una única carga positiva y cuando están hidratados es prácticamente imposible distinguir uno de otro; sin embargo, el  $\text{Na}_v$  tienen la capacidad de discriminar el  $\text{Na}^+$  del  $\text{K}^+$  con una razón de permeabilidad >10:1 y una velocidad de 10 millones de iones por segundo (Hanck & Fozzard, 2007). La selectividad a los iones de sodio por parte del  $\text{Na}_v$  corre a cargo de la parte más estrecha del canal en el DFP, conocida como filtro de selectividad, esta región es capaz de identificar iones con la misma carga y medida. En células eucariontes el filtro de selectividad está formado por la alineación de aspartato (D) en DI, glutamato (E) en DII, lisina (K) DIII, y alanina (A) DIV. Se ha demostrado que la presencia de Lisina es necesaria y suficiente para producir la selectividad de sodio en los canales, una mutación en la expresión de este residuo disminuye drásticamente e incluso revierte la selectividad del canal (Dudev & Lim, 2014).

Otro elemento importante en los  $\text{Na}_v$  son las compuertas de inactivación, la compuerta está conformada por una hélice  $\alpha$  rígida de dos vueltas y cuatro residuos de aminoácidos importantes: isoleucina (I), fenilalanina (F), metionina (M) y treonina (T); estos aminoácidos son esenciales para mantener la compuerta cerrada (Ghovanloo, Aimar, Ghadiry-Tavi, Yu, & Ruben, 2016). Una mutación en la

secuencia de los aminoácidos puede provocar un retraso o abolición de la inactivación del canal (Payandeh, Gamal El-Din, Scheuer, Zheng, & Catterall, 2012).

Gracias al funcionamiento de la compuerta de inactivación, resulta posible identificar tres estados relativamente estables de los canales  $Na_v$ : en reposo (cerrados), activados (abiertos) e inactivados (cerrados) (Catterall, Goldin, & Waxman, 2005). La transición entre los estados estables recibe el nombre de “control de puerta” o regulación. La inactivación en los canales de sodio es un fenómeno sumamente importante porque corresponde al periodo refractario del canal que impacta directamente en el establecimiento del potencial de acción y por consecuencia en la función celular (Kandel et al., 2000).

Las isoformas de la subunidad  $\alpha$  se encuentran expresadas ampliamente por todo el organismo y sus alteraciones están asociadas con condiciones clínicas bien definidas, como se muestra en la Tabla 1.

Tejido	Isoforma $Na_v$	Manifestación clínica de
<b>Sistema Nervioso Central</b>	1.1, 1.2, 1.3, 1.6	Epilepsia, migraña, autismo, ataxia
<b>Retina</b>	1.8, 1.9	Proceso visual alterado
<b>Neuronas sensoriales olfatorias</b>	1.7	Anosmia
<b>Neuronas sensoriales vagales que inervan las vías respiratorias</b>	1.7, 1.8, 1.9	Tos
<b>Músculo Cardíaco</b>	1.5, 1.8	Síndrome de Brugada, Síndrome del QT, fibrilación auricular
<b>Nervios y músculos relacionadas con la respiración</b>	$Na_v$ 's sensibles a TTX	Cese de la respiración (intoxicación por TTX)
<b>Células <math>\beta</math> pancreáticas</b>	1.7	Diabetes
<b>Músculo Esquelético</b>	1.4	Parálisis periódica hiperkalémica, Paramiotonía congénita, Parálisis periódica

		hipokalémica
<b>Piel</b>	1.7, 1.8	Desórdenes del dolor, Comezón paroxística
<b>Neuronas de los ganglios de las raíces dorsales</b>	1.6, 1.7, 1.8, 1.9	Desórdenes del dolor, Comezón paroxística
<b>Células cancerígenas metastásicas</b>	1.1 – 1.9 y subunidades $\beta$	Ovárico, cervical, prostático, mamario, colónico, pulmonar, melanoma, linfoma.

*Tabla 1: Expresión, isoformas y efectos clínicos de los Nav. Modificado de Lera Ruiz, M. and Richard L. Kraus., 2015.*

Las subunidades  $\beta$  de los Nav, con excepción de la  $\beta 1B$ , consisten en una única cadena de aminoácidos con un solo segmento transmembrana, un extremo N-terminal en el dominio extracelular y un extremo C-terminal en el dominio intracelular (O'Malley & Isom, 2015). Las subunidades  $\beta$ , afectan el tiempo y la dependencia de voltaje de la subunidad principal, además, están involucradas en el ensamblaje y expresión de los canales iónicos (Bouza & Isom, 2018). De manera interesante, se ha observado que las subunidades  $\beta$  son miembros de la familia de las inmunoglobulinas de moléculas de adhesión celular (CAMs) lo que les permite estar en contacto con la matriz extracelular. Hasta el momento se han logrado identificar cuatro subunidades  $\beta$  distintas en los canales Nav: Nav $\beta 1$  a Nav $\beta 4$  (Goldin, 2001).

### **Hipótesis de Sodio de Hodgkin, Huxley y Katz**

Una de las primeras teorías que fueron postuladas para explicar el movimiento de iones a través de las membranas de las células excitables fue propuesta por Julius Bernstein en 1902, en esta teoría se consideraba que cuando ocurría un aumento inespecífico en la conductancia de la membrana plasmática durante el potencial de acción, el potencial de membrana tendería a ser 0 minivolts porque únicamente tomaba en cuenta que las células eran selectivamente permeables al potasio; sin embargo, autores como Hodgkin, Huxley, Curtis y Cole pudieron medir con gran exactitud el valor final del potencial de membrana durante el potencial de acción y se dieron cuenta que el valor era mucho mayor a 0 minivolts y a esa magnitud se

le denominó sobretiro. En 1949 Hodgkin y Katz propusieron la hipótesis de sodio en la que mencionaban que el sobretiro era consecuencia de un gran aumento en la conductancia de sodio y que el axón de calamar no pierde permeabilidad a potasio, como lo proponía Bernstein, en cambio, la permeabilidad se volvía específica para sodio, con esto se llegó a la conclusión de que la amplitud del potencial de acción dependía de la concentración externa de sodio (Ávila & Cruz, 2013; Carmeliet, 2019).

### **Potencial de acción cardiaco**

Cada uno de los latidos cardiacos es resultado de procesos bien sincronizados de iniciación, transmisión y señalización eléctrica que se ven reflejados en la contracción de los cardiomiocitos, estos procesos son iniciados principalmente por los canales de sodio activados por voltaje  $Na_v1.5$ . El correcto funcionamiento del corazón como bomba, depende de la correcta secuenciación de la actividad eléctrica de las células denominadas marcapasos y la propagación de esa actividad, a través de los ventrículos. (Li et al., 2021; Nerbonne & Kass, 2005).

La fase inicial del potencial de acción cardíaco (PAC) es denominada fase 0 y es provocada por la rápida apertura de los canales de sodio dependientes de voltaje  $Na_v1.5$  provocando una corriente entrante de ese ion ( $I_{Na^+}$ ) (Figura 3).

La fase 1 se da como resultado a una breve repolarización de la membrana plasmática, la inactivación de los canales de  $Na^+$  y la activación de una corriente de salida de  $K^+$  a través de los  $K_v4.3$  y  $4.2$ ; estos canales son responsables de la corriente  $I_{to}$  que se activa aproximadamente a  $-30$  mV y se inactiva alrededor de  $+10$  mV contribuyendo también a la repolarización del cardiomiocito (Gaborit et al., 2007; Virag et al., 2011).

La despolarización de la membrana plasmática también activa los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L estos elementos son responsables del establecimiento de la fase de meseta o "*plateau*" del potencial de acción (fase 2). Esta corriente juega un papel importante en el proceso de acople-excitación-contracción (Bers, 2008), ya que el calcio que ingresa al cardiomiocito a través de los  $Ca_v1.2$ , es utilizado para la

liberación de más calcio desde el retículo sarcoplásmico, un proceso denominado liberación de calcio inducida por calcio (Dibb, Eisner, & Trafford, 2007). La cinética de estos canales ha demostrado que esta corriente se activa muy rápido y su inactivación no depende únicamente del valor de potencial de membrana, más bien está relacionada con las concentraciones intracelulares del ion, sin embargo, se ha identificado que el valor medio de voltaje para este proceso de -13 mV con una constante de tiempo de 553 ms (Lin, Aladejebi, & Hockerman, 2011; Schneider et al., 2015; Varro et al., 2021). Existe otro tipo de corriente denominada  $I_{CaT}$  que está más presente en células nodales donde se les relaciona con la actividad marcapasos, aunque poco se conoce de ellas se sabe que son provocadas por los Cav3.1 y 3.2 y que se activan a valores más negativos que la  $I_{CaL}$  (Mangoni et al., 2006)

La fase de repolarización (fase 3) es causada por la inactivación de los canales Cav y la iniciación de múltiples corrientes de K<sup>+</sup> activadas por voltaje denominadas “rectificadoras de salida”; las más importantes son la  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$  e  $I_{Kur}$ . La  $I_{Kr}$  (rapid delayed rectifying potassium current) es provocada por la apertura de los Kv11.1 o hERG se activa a valores de +30 mV con una  $\tau$  de 31ms (Jost et al., 2005); su inactivación es a partir de los -40 mV (Smith, Baukrowitz, & Yellen, 1996), los Kv11.1 se recuperan rápidamente de la inactivación y pueden volverse a abrir en la fase de meseta del PAC asegurando la repolarización de la membrana plasmática, a esto se suma su lenta inactivación de 6800ms, asegurando que la corriente se encuentra activa a lo largo del PAC (Varro et al., 2021).

La  $I_{Ks}$  es comandada por los Kv7.1, se activa lentamente a potenciales mayores a 30 mV con una  $\tau$  de aproximadamente 900-1000 ms (Jost, Papp, & Varro, 2007), es por eso que se le reconoce como el componente lento de la corriente rectificadora de salida tardía. Su inactivación se produce con una  $\tau$  menor a los 200 ms a los -40 mV (Virag et al., 2001). Se tiene conocimiento que múltiples sustancias endógenas, tienen la capacidad de regular la corriente, entre ellas la progesterona que puede provocar un incremento en la  $I_{Ks}$ ; por otro lado, enfermedades como la diabetes mellitus reducen la  $I_{Ks}$  (Lengyel et al., 2007;

Odening & Koren, 2014). La  $I_{Kur}$  o corriente rectificadora tardía ultrarrápida se encuentra distribuida en todo el corazón pero parece tener una importancia mayor en las aurículas; se activa a potenciales de membrana mayores a 0 mV con una  $\tau$  de apenas 13 ms (Fedida et al., 1993), su inactivación por otro lado, se da con una  $\tau$  de 609 ms cuando se encuentra a potenciales de membrana de +40mV, esta corriente está controlada por estimulación adrenérgica a través de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos provocado aumento y disminución de la corriente, respectivamente (Yue, Feng, Li, & Nattel, 1996).

En la fase de reposo (fase 4 del PAC) la corriente  $I_{K1}$  se encarga de mantener el potencial de membrana a valores estables por tanto esta corriente es conocida como una rectificadora de entrada. Los canales rectificadores de entrada de potasio Kir2.1, 2.2, 2.3 y 2.4 son complejos proteicos formados por 4 subunidades de 2 segmentos transmembrana.

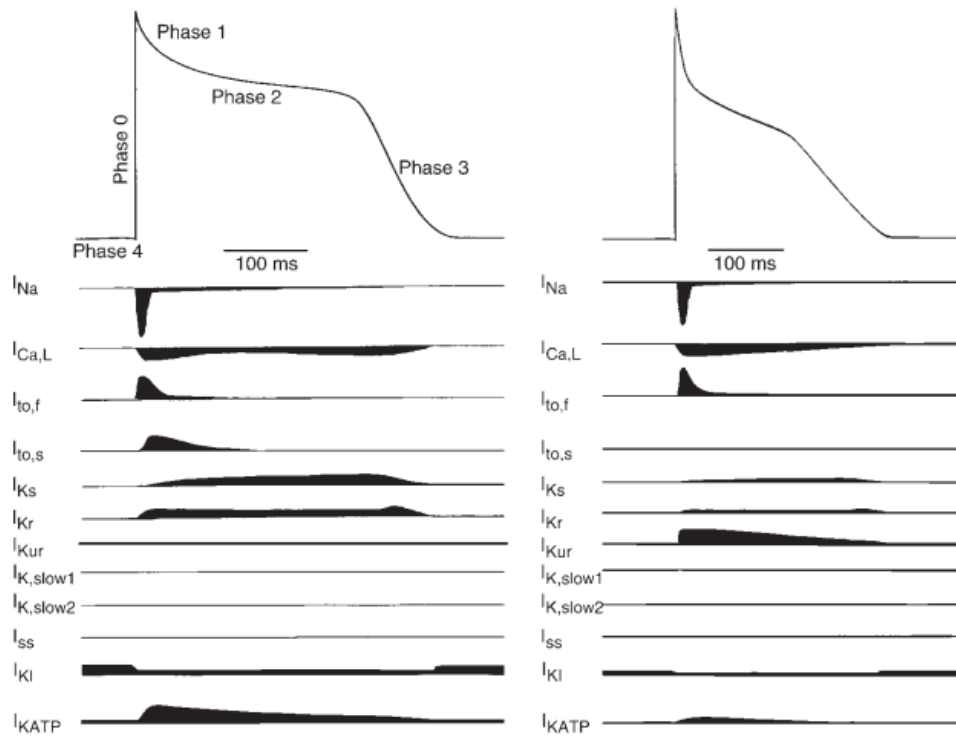


Figura 3: Diferentes formas de potencial de acción en células cardiacas. Tomado de Nerbonne & Kass., 2005.

## **El canal hNav1.5 y la corriente $I_{Na}$ .**

El PAC es responsable de la contracción normal del corazón, la primera fase del PAC es iniciada por la apertura de los Nav1.5 que mueven el potencial de reposo del cardiomiocito de -85 mV a +45 mV, por una corriente de entrada rápida de sodio, en el estado activo del canal (Nerbonne & Kass, 2005).

La estructura del Nav1.5 es similar a la de cualquier otro canal de sodio activado por voltaje, con cuatro dominios intercalados que se ensamblan para formar la subunidad alfa. El Nav1.5 y el 1.7 poseen un 75% de compatibilidad en su secuencia de aminoácidos pero tiene algunas otras particularidades que modifican su cinética y le confieren propiedades únicas (Jiang et al., 2020; Shen, Liu, Wu, Lei, & Yan, 2019). Es bien sabido que la TTX tiene la capacidad de bloquear los canales de sodio dependientes de voltaje, sin embargo, en el Nav1.5 el efecto de la TTX es menor, esto se debe a que este canal presenta cisteína y arginina unidas al lado extracelular del aspartato; en esos mismos sitios, el Nav1.7 (un canal sensible a TTX) posee tirosina y aspargina. La tirosina es un componente clave y su ausencia disminuye hasta 500 veces la afinidad del Nav1.5 por la TTX (Sunami, Glaaser, & Fozzard, 2000).

El umbral para la activación de los Nav1.5 es muy negativo pues se activan a aproximadamente -55 mV (Detta et al., 2015). Antoni y colaboradores refieren que el potencial de activación para los Nav1.5 es de -50 mV. La amplitud de la corriente  $I_{Na^+}$  es sumamente grande, aproximadamente 100mA/cm<sup>2</sup>, esto debido a la gran densidad de canales (Antoni, Bocker, & Eickhorn, 1988; E. S. Bennett, 2001).

Posterior a la rápida activación, el canal debe inactivarse para asegurar las siguientes fases del PAC, esto se logra mediante los mecanismos de inactivación rápida y lenta. La inactivación rápida del Nav1.5 se produce por el mecanismo “bola y cadena” donde el asa DIII-DIV interrumpe la conducción de iones a través del canal, este proceso inicia mientras la activación aún se está desarrollando (Goldfarb, 2012). La inactivación lenta, en contraste, se lleva a cabo por un

reordenamiento de la estructura del poro, que impide la conducción de los iones de  $\text{Na}^+$ , el reordenamiento se da por el segmento S4 del DIV, el asa S5-S6 del DII y el segmento S6 de DII (Goldin, 2003). El valor de la constante de inactivación de los  $\text{Nav}1.5$  a  $-10$  mV es de  $\tau_1=0.6\text{ms}$  y  $\tau_2=4\text{ms}$ , la inactivación media se logra a los  $-60$  mV o  $-70$  mV (Antoni et al., 1988), mientras que la recuperación de la inactivación es alcanzada con una constante de tiempo de  $2\text{-}20$  ms a voltajes negativos (Fozzard et al., 1986).

Alteraciones en los procesos de inactivación son responsables de patologías cardíacas denominadas canalopatías, dentro de las que destacan, el síndrome QT largo tipo III y el síndrome de Brugada (Detta et al., 2015; Ghovanloo et al., 2016).

Desde los primeros estudios con la técnica electrofisiológica de voltage-clamp fue posible concluir que el curso temporal de la  $I_{\text{Na}^+}$  cardíaca es mayor en la  $I_{\text{Na}^+}$  de neuronas, en la figura 4 es posible observar este fenómeno pues se grafican las variables voltaje-tiempo y corriente-tiempo para la  $I_{\text{Na}^+}$  cardíaca y neuronal, bajo condiciones experimentales idénticas (Dudel & Rudel, 1970).

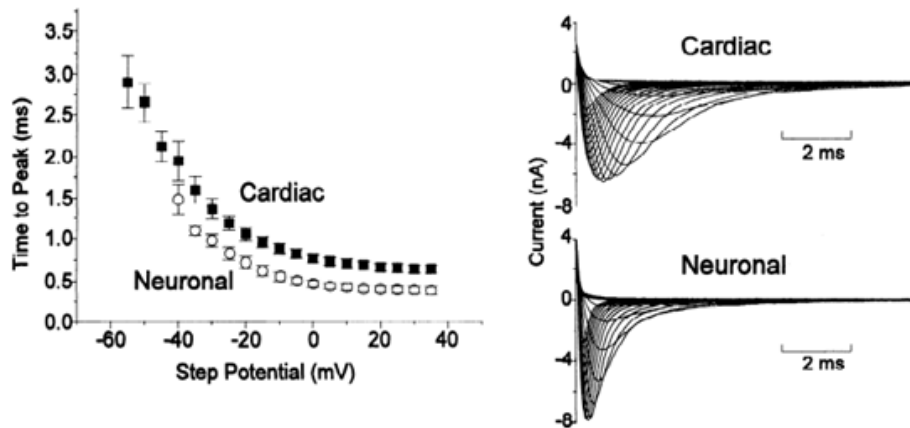


Figura 4: Diferencias biofísicas entre la  $I_{\text{Na}^+}$  cardíaca y neuronal. Tomado de Dudel & Rudel., 1970.

## **Sistema endocannabinoide**

El sistema endocannabinoide está conformado por genes que codifican receptores específicos para cannabinoides, sustancias endocannabinoides (eCBs) y las enzimas relacionadas con los procesos de síntesis y degradación de estas sustancias. Con el paso de los años el sistema endocannabinoide ha sido estudiado dejando ver que se trata de una red muy compleja y cuyos elementos se distribuyen casi de forma ubicua en el organismo. En los últimos años, este sistema ha sido relacionado con procesos fisiológicos y desórdenes neurológicos como la cognición, ansiedad, depresión, entre otros. La evidencia actual de los efectos de los cannabinoides y endocannabinoides sobre el organismo, han llevado a apoyar estudios científicos, la regulación y prescripción terapéutica de estas sustancias y con ello se ha abierto un amplio abanico de posibilidades para involucrarlas (Joshi & Onaivi, 2019).

## **Receptores cannabinoides**

La primera evidencia de que los cannabinoides tienen receptores específicos en el cuerpo humano fue publicada por Howlett y colaboradores en 1988 (Devane et al., 1992), él pudo confirmar que la acción de estas sustancias tiene la capacidad de inhibir la enzima adenilato ciclasa y que el nivel de las respuestas obtenidas es dependiente de la dosis. En 1990 Matsuda y colaboradores pudieron clonar el primer receptor cannabinoide denominado CB<sub>1</sub>, mientras que un segundo receptor periférico CB<sub>2</sub> fue identificado por Munro y colaboradores en 1993. Las dos proteínas descritas pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteína G (GPCRs) y comparten un 48% de similitud en la secuencia de aminoácidos (Matsuda, Lolait, Brownstein, Young, & Bonner, 1990; Munro, Thomas, & Abu-Shaar, 1993).

## **Receptor CB<sub>1</sub>**

Aunque inicialmente se propuso que los receptores CB<sub>1</sub> únicamente estaban distribuidos en el cerebro, actualmente tenemos conocimiento que este receptor

se encuentra en otros tejidos periféricos como la médula espinal, sistema nervioso periférico, células del sistema inmune, glándulas adrenales, corazón, hipófisis, pulmones, aparato reproductivo, tracto gastrointestinal, por mencionar algunos; estos hallazgos han sido posibles gracias al desarrollo de tecnología y técnicas microscópicas que nos han acercado al conocimiento de la morfología y distribución de estos receptores (Cristino, Imperatore, & Di Marzo, 2017; Howlett et al., 2002).

El receptor CB<sub>1</sub> se encuentra presente durante todo el curso y desarrollo de la vida humana, incluso hay evidencia de que estos receptores se expresan desde el desarrollo embriológico, lo que sugiere una gran participación en el desarrollo del sistema nervioso. La distribución de estos receptores varía según la etapa de desarrollo que se esté analizando, por ejemplo, algunos autores mencionan que el número de receptores expresados en cerebros de rata aumentan cuando se pasa de la adolescencia a la etapa adulta y que en los primeros años de vida se pueden localizar más receptores en la sustancia blanca mientras que en la adultez esta condición se revierte (Duranti et al., 2022; Verdurand et al., 2011).

Un hallazgo importante fue descubrir que los CB<sub>1</sub> se expresan en las sinapsis del sistema nervioso y específicamente en las células presinápticas, en las que cumplen la función de regular la liberación de neurotransmisores como GABA o glutamato a través de la inhibición de canales de calcio dependientes de voltaje, esta parece ser la tarea más importante del sistema endocannabinoide (Howlett et al., 2002; Katona & Freund, 2008). En estudios un poco más recientes se ha podido aislar a los CB<sub>1</sub> en las membranas externas de las mitocondrias en donde se les ha relacionado con la inhibición del transporte de electrones, teniendo influencias en el metabolismo de las neuronas e impactando en la memoria (Hebert-Chatelain et al., 2016).

Según los análisis de cristalografía, el receptor CB<sub>1</sub> está conformado por 7 segmentos transmembrana (I-VII), unidos por 3 asas extracelulares (ECL1-3), 3 asas intracelulares (ICL1-3) y una hélice anfipática VIII; en los residuos 99-112 del extremo N terminal se forma un bucle en forma de V, que funciona como un tapón

que evita la unión de un ligando con el receptor desde el ambiente extracelular. Se ha demostrado que la ECL2 es la responsable del correcto funcionamiento del receptor, esta asa está formada por 21 residuos y las cisteínas del sitio 257 y 271 son críticas para la función del receptor (Fay, Dunham, & Farrens, 2005).

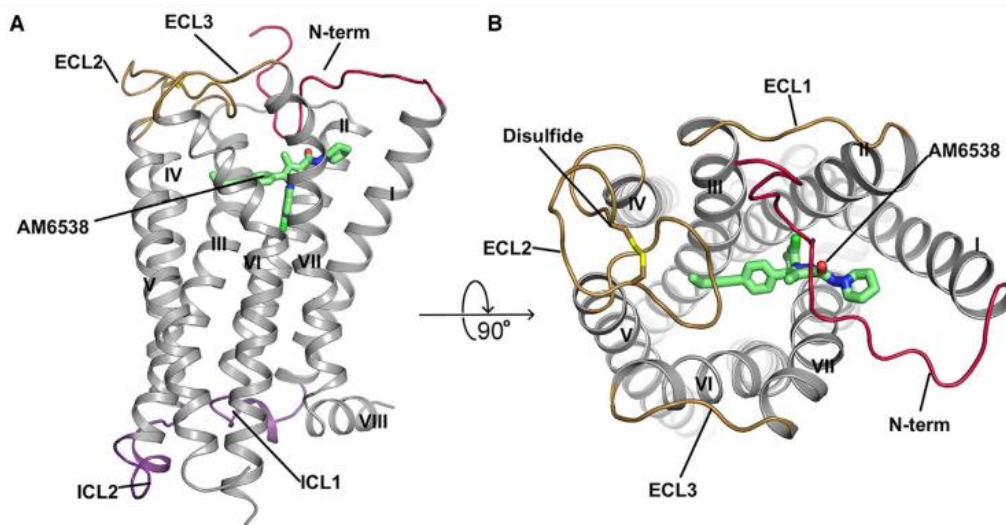


Figura 5: Estructura del receptor CB1 unido al análogo cannabinoide AM6538. a) Vista lateral b) vista superior. Tomado de Hua et al., 2016.

## Receptor CB<sub>2</sub>

Al igual que cuando se descubrió el CB<sub>1</sub>, los receptores CB<sub>2</sub> inicialmente se creía que estaban distribuidos en un solo sistema corporal, en este caso el sistema inmune, pues fueron identificados en linfocitos B, linfocitos T, monocitos, en nódulos linfáticos y el vaso (Howlett et al., 2002).

Con el paso de los años y según las observaciones de algunos científicos se propuso que los CB<sub>2</sub> podían expresarse en el cerebro de los mamíferos y el sistema nervioso central, pero únicamente en condiciones patológicas (Pacher & Mechoulam, 2011). En la actualidad, tenemos el conocimiento de que los receptores CB<sub>2</sub> se pueden identificar en el cerebro sin la necesidad de que exista patología, están distribuidos sobre todo en las células posinápticas y los reportes actuales muestran que la activación de estos receptores conduce a una

hiperpolarización de larga duración al modificar la cinética de los cotransportadores sodio-bicarbonato (Stumpf et al., 2018).

### **Otros receptores para cannabinoides**

Además de los CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> se han podido asociar a sustancias cannabinoides a otros receptores, estos son los TRPV1, PPAR<sub>γ</sub> y PPAR<sub>α</sub>; siendo el más estudiado, el canal TRPV1. El canal TRPV1 se encuentra distribuido por todo el organismo, es posible encontrarlo en el 50% de las neuronas sensoriales somáticas y viscerales, en la asta posterior de la médula espinal, en el hipocampo y cerebelo, también se expresa en neuronas perivasculares donde su activación induce vasodilatación por la liberación del péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP). La activación del TRPV1 se ha asociado con el establecimiento de una corriente entrante de Ca<sup>2+</sup> y despolarización de la membrana plasmática, por lo tanto, regula la liberación de neurotransmisores como GABA y glutamato. La estructura del TRPV1 es homóloga al canal de potasio activado por voltaje (K<sub>v</sub>) con 4 dominios homólogos de 6 segmentos transmembrana cada uno y los extremos C y N en el espacio intracelular (Bevan, Quallo, & Andersson, 2014; Cristino, Bisogno, & Di Marzo, 2020). Se ha propuesto que el TRPV1 y el CB<sub>1</sub> comparten los ligandos para anandamida (Lowin & Straub, 2015).

Por último, los receptores PPAR<sub>γ</sub> y PPAR<sub>α</sub> (Figura 6) están distribuidos en astrocitos, neuronas y microglía, se ha asociado a estos receptores con efectos antiinflamatorios y neuroprotectores en estadíos agudos y crónicos de lesiones celulares como trauma o isquemia. La estructura de estos canales consta de cuatro dominios denominados A/B, C, D y E/F; en el dominio A/B posee un sitio independiente a la unión a ligando, responsable de la actividad transcripcional del canal y en el dominio E/F está el sitio de unión a ligando donde se unen ligandos endocannabinoides, en especial, la anandamida (Iannotti & Vitale, 2021).



Figura 6: Estructura del receptor PPAR. Tomado de Iannotti & Vitale., 2021.

## Sustancias cannabinoides y endocannabinoides

Desde hace más de cien años, se registraron intentos por purificar y aislar los compuestos activos que dan las propiedades inquietantes a la marihuana (*Cannabis sativa*), sin embargo y debido a la complejidad de esa tarea, todos los intentos por dilucidar el principal componente entre las más de 60 sustancias que componen a la planta fueron en vano. No fue hasta 1964 cuando Gaoni y Mechoulam utilizaron las técnicas de separación más novedosas en ese tiempo para al fin identificar al  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC) como el principal responsable de las propiedades de la marihuana, en la década de 1960 también se pudo conocer otro elemento con estructura similar al THC, el cannabidiol (CBD) al que no se le dio la importancia que merecía porque no parecía tener los efectos más evidentes sobre el sistema nervioso central como el THC, pero que desde hace algunas décadas ha sido blanco de investigaciones donde se ha demostrado su acción como un potente antiinflamatorio (Mechoulam & Parker, 2013).

El THC y el CBD son compuestos derivados de sus precursores: el ácido  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinólico (THCA) y el ácido cannabidiólico respectivamente, que sufren un proceso de descarboxilación por acción de la luz y la temperatura.

El THC generalmente es introducido al organismo por la inhalación de cigarrillos, la ingesta de cápsulas de dronabinol o mezclado con alimentos y líquidos, dependiendo de la vía de administración la absorción puede ir de 5 y hasta los 120 minutos, llegando al torrente circulatorio donde es distribuido en un 90% en el plasma y el 10 % en los glóbulos rojos. Posteriormente, es llevado a los tejidos con alta vascularización como el hígado, corazón, la grasa, pulmones, intestino, riñón, vaso, placenta y corteza adrenal. El metabolismo del THC está dado en el hígado por la enzima P450 y su eliminación es lenta debido a la redistribución de los tejidos al plasma, es excretado principalmente en orina y heces fecales. Casi todas las acciones provocadas por el THC se dan como respuesta a interacciones agonistas-antagonistas (Grotenhermen, 2003).

En la tabla 2 se enlistan los efectos del THC en los diferentes sistemas corporales por la estimulación del sistema endocannabinoide.

Sistema corporal	Efectos
Psique y percepción	Fatiga, euforia, sensación de bienestar, disforia, ansiedad, reducción de la ansiedad, despersonalización, aumento de la percepción sensorial, aumento de la experiencia sexual, alucinaciones, alteración de la percepción del tiempo, agravamiento de los estados psicóticos, sueño.
Cognición y desempeño psicomotor	Pensamiento fragmentado, aumento de la creatividad, alteración de la memoria, marcha inestable, ataxia, dificultad para hablar, debilidad, deterioro o mejora de la coordinación motora.
Sistema Nervioso	Analgésia, relajación muscular, estimulación del apetito, vómitos, efectos antieméticos, neuroprotección en caso de isquemia e hipoxia.
Temperatura corporal	Disminución de la temperatura corporal.
Sistema Cardiovascular	Taquicardia, aumento de la actividad cardíaca, aumento del gasto cardíaco, aumento de la demanda de oxígeno, vasodilatación, hipotensión ortostática, hipertensión (en posición horizontal), inhibición de la agregación plaquetaria.
Ojos	Conjuntivas enrojecidas, reducción del flujo lagrimal, disminución de la presión intraocular.
Sistema Respiratorio	Broncodilatación.
Tracto Gastrointestinal	Hiposalivación y sequedad de boca, reducción de los movimientos intestinales y retraso en el vaciado gástrico.
Sistema Hormonal	Influencia sobre la hormona luteinizante, la hormona foliculoestimulante, la testosterona, prolactina, somatotropina, hormona estimulante de la tiroides, metabolismo de la glucosa, reducción del recuento y la movilidad de los espermatozoides, alteración del ciclo menstrual y supresión de la ovulación.

Sistema Inmune	Alteración de la inmunidad celular y humoral, estimulación inmunológica, efectos antiinflamatorios y antialérgicos.
Desarrollo Fetal	Malformaciones, retraso en el crecimiento, alteración del desarrollo cerebral fetal y postnatal desarrollo cerebral, deterioro de las funciones cognitivas.
Material genético y cáncer	Actividad antineoplásica, inhibición de la síntesis de ADN, ARN y proteínas.

*Tabla 2: Efectos fisiológicos del THC, reportados en estudios in vivo o in vitro. Tomado de Grotenhermen., 2003.*

La farmacocinética del CBD depende de la vía de administración del compuesto, siendo la administración oral y la inhalación las principales formas en las que se administra. Tanto la farmacocinética como la farmacodinamia son dependientes de la dosis. Cuando se administra CBD por vía oral, apenas se alcanza un 6% de biodisponibilidad, porque la sustancia es altamente lipofílica, sin embargo, la biodisponibilidad puede subir a 12-20% cuando se toma con alimentos, en esta misma vía de administración, se consiguen las concentraciones máximas en la sangre luego de 2.5-5 horas; en contraste, cuando se inhala el CBD se logra una biodisponibilidad del 30% y la concentración máxima en sangre se obtiene después de 3-10 minutos. El metabolismo de la sustancia se da casi por completo en el hígado por acción de la enzima CYP450 (Alves, Amaral, Teixeira, & Correia-da-Silva, 2020).

### **Anandamida**

El araquidoniletanolamida (AEA) o anandamida fue la primera sustancia endógena identificada en el organismo con la capacidad de activar el sistema endocannabinoide, fue denominada de esta manera por la referencia a la palabra del sánscrito ananda que significa felicidad, dicha o placer. Se trata de una amida de ácido graso, su síntesis en el organismo requiere al ácido araquidónico que se une a una fosfatidiletanolamina para formar N-araquidonil fosfatidiletanolamina, la liberación de la AEA requiere actividad de varias fosfolipasas, se ha podido evidenciar este proceso en neuronas involucradas en la memoria, procesos de pensamiento superior, en el hipocampo, tálamo, corteza cerebral, núcleo estriado

y en menor medida en cerebelo, bulbo raquídeo y protuberancia (Crocq, 2020; Smita, Sushil Kumar, & Premendran, 2007).

Ya que la AEA es una sustancia lipofílica, puede fácilmente difundir a través de las membranas plasmáticas y no necesita ser almacenado en vesículas, por esta razón es que la AEA no es considerado un neurotransmisor clásico. El mecanismo de acción de esta sustancia se da como respuesta a la unión con receptores del sistema endocannabinoide CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, el efecto principal de la anandamida es inhibir la actividad de la adenilato ciclasa provocando una disminución de las concentraciones intracelulares de AMPc (Biringer, 2021).

## Antecedentes Específicos

Como se ha descrito antes, el sistema endocannabinoide tiene participación en todos los sistemas corporales del ser humano, sin embargo para muchos investigadores ha resultado interesante estudiar la relación de los cannabinoides con el sistema cardiovascular, por la evidente manifestación de sus signos y síntomas y el impacto que tiene en la vida. En la figura 7 se muestra un mapa de la distribución del sistema endocannabinoide en las diferentes líneas celulares que están conformando al corazón, así como las sustancias que principalmente están involucradas en la estimulación de dichos receptores

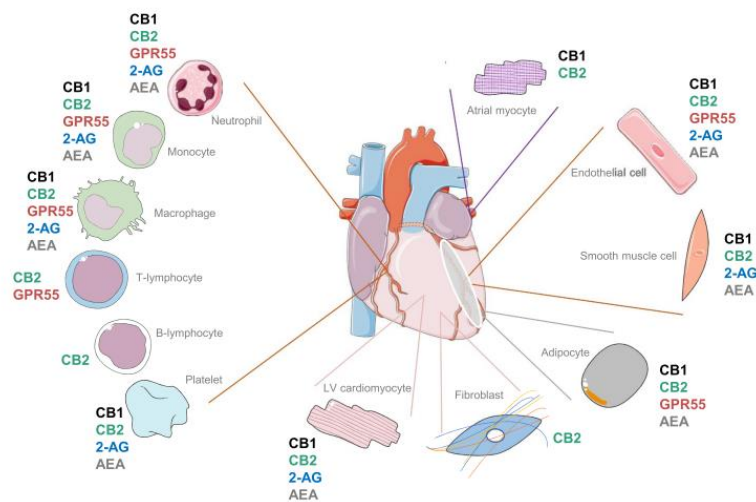


Figura 7: Mapeo de los tipos celulares del corazón, sus receptores sensibles a endocannabinoides y las principales sustancias estimuladoras. Tomado de Puhl, 2020.

Los efectos fisiológicos sobre el corazón relacionados con el sistema endocannabinoide parecen estar gobernados por los receptores CB<sub>1</sub> ya que cuando son estimulados se han podido identificar efectos negativos en el cronotropismo e inotropismo, así como respuestas vasodilatadoras, estos efectos se pueden explicar en gran medida por la liberación de neurotransmisores derivado de la estimulación de receptores CB<sub>1</sub> de neuronas, sin embargo, los endocannabinoides también pueden provocar respuestas locales en células como los cardiomiocitos, células endoteliales o células de músculo liso vascular (Puhl, 2020).

Actualmente se cuenta con evidencia de la modulación que sufren los canales iónicos dependientes de voltaje por la interacción con sustancias cannabinoides. Por ejemplo, en un estudio publicado en 2014 por Foadi y colaboradores, se demostró que el ácido ajulémico, un derivado sintético del THC, tiene la capacidad de inhibir las isoformas Nav1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.7 y 1.8; expresadas en células HEK 293, según los resultados de estos autores, la inhibición media de la corriente de sodio se consigue con apenas 10 µM de la sustancia, lo que deja claro la potencia de bloqueo de los cannabinoides (Foadi et al., 2014). Un estudio del 2022 publicado por Marchese y colaboradores en el que se expresó el canal Nav1.9 en células CHO-K1 se probó otra sustancia cannabinoide denominada ACEA (araquidonil-2-cloroetilamina), demostrando que con 10 µM fue posible una reducción de la corriente de sodio del 50%. Además, este estudio sugiere mediante “*modelaje in silico*”, que la ACEA y posiblemente otras sustancias cannabinoides, podrían tener como sitio de unión el utilizado por los anestésicos locales (Marchese-Rojas et al., 2022).

El AEA también se ha podido relacionar con cambios en la actividad eléctrica de las células excitables a través de modulación de canales iónicos activados por voltaje (Figura 8). En un estudio publicado por Okura y cols. se estudiaron las respuestas en las corrientes de sodio provocadas por los canales Nav1.2, 1.6, 1.7 y 1.8 en ovocitos de *Xenopus laevis*, mediante la técnica de voltage-clamp, encontrando que la anandamida inhibe las corrientes de sodio al bloquear los

canales en estado inactivo, disminuyendo la cantidad de canales disponibles para la conducción de  $\text{Na}^+$ . (Okura et al., 2014).

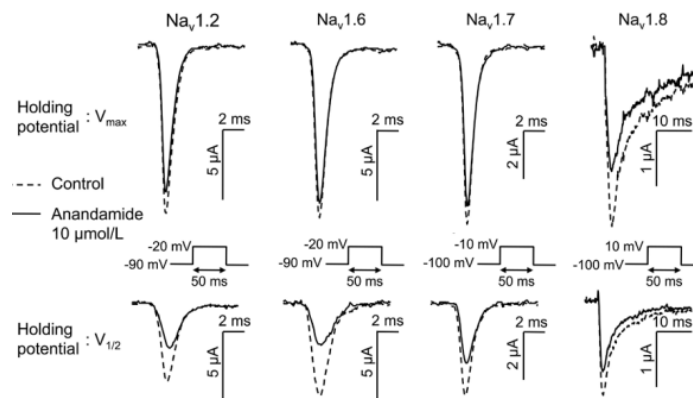


Figura 8: Efecto inhibitorio del AEA en el pico de la corriente de entrada de  $\text{Na}^+$  en diferentes isoformas  $\text{Na}_v$ . Tomado de Okura y cols., 2014.

La AEA también ha demostrado modular los canales de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje. Amorós y cols. expresaron canales  $\text{K}_v3.4$ , responsables de la corriente  $I_{to1}$ , en células CHO, que no expresan receptores CB para estudiar los efectos de diferentes endocannabinoides utilizando la técnica de voltage-clamp de célula completa; demostrando que los endocannabinoides incluyendo la AEA tienen la capacidad de inhibir las corrientes  $I_{to1}$ , responsables de la amplitud y duración de la fase de meseta del potencial de acción cardíaco. La inhibición de las corrientes  $I_{to1}$ , es dependiente de la concentración del endocannabinoide y además mientras más larga sea la cadena del ácido graso, se ha reportado mayor bloqueo de los canales. Es importante mencionar que aunque no se ha descrito un mecanismo de bloqueo del canal, se sabe que los endocannabinoides ejercen su acción desde el exterior de la célula y un probable sitio de unión podría ser el segmento S6 del dominio I del canal (Amoros et al., 2010; Xiao et al., 2001).

Con esta información podemos plantear una relación entre las sustancias cannabinoides y los canales  $\text{Na}_v1.5$ . El objetivo de este estudio es determinar cuáles son los efectos electrofisiológicos del  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol sobre los canales de sodio  $\text{hNa}_v 1.5$ .

## JUSTIFICACIÓN

Desde que los cannabinoides fueron descubiertos se han estudiado sus efectos y los sistemas implicados en el mecanismo de acción de tales sustancias, logrando importantes avances que han podido dilucidar los efectos terapéuticos de estas sustancias, impactando en la comprensión de procesos fisiológicos importantes como el dolor. Existe evidencia que demuestra la notable modulación que sufren los canales iónicos activados por voltaje, relacionados con el establecimiento y propagación del potencial de acción celular, cuando se les hace interactuar con sustancias endocannabinoides como la anandamida, estas interacciones se han estudiado sobre todo en isoformas expresadas en células del sistema nervioso como los Nav1.2, Nav1.6, Nav1.7, Nav1.8 y Nav1.9; sin embargo, poca información se tiene sobre los efectos electrofisiológicos de las sustancias cannabinoides y en especial del  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol en isoformas como la Nav1.5, presente en células cardíacas. Por lo antes mencionado, resulta pertinente estudiar los efectos que produce el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol en los Nav1.5 expresados de forma heteróloga en ovocitos de rana *Xenopus laevis*, con el fin de esclarecer los mecanismos de dicha sustancia en esta isoforma y su efecto en el potencial de acción cardíaco y con ello aproximar sus efectos a la fisiología del corazón.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque la investigación de los mecanismos de acción de los cannabinoides ha comenzado hace muchos años atrás, debido a los dilemas bioéticos derivados del manejo y experimentación con estas sustancias, ha sido complicado obtener basta información respecto a procesos moleculares desencadenados por la interacción de membranas celulares con tales sustancias. Derivado de esta problemática, aunque se cuenta con información sobre los efectos de sustancias como la anandamida en canales iónicos activados por voltaje, aún quedan algunas preguntas sin responder acerca de lo que ocurre en sistemas corporales diferentes al sistema nervioso, cuando se les hace interactuar con cannabinoides, donde la evidencia publicada no arroja suficiente información.

Es por lo antes mencionado que surge la pregunta de investigación. ¿De qué manera el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol modula los canales iónicos activados por voltaje hNav1.5?

## **HIPÓTESIS CIENTÍFICA**

El  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol reduce la corriente iónica de sodio a través de los canales hNav1.5 expresados en ovocitos de rana *Xenopus laevis*.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

- Determinar los efectos electrofisiológicos del  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol sobre los canales de sodio hNav1.5 expresados en ovocitos de rana *Xenopus laevis*.

### **Objetivos Específicos**

- Determinar la concentración efectiva 50 (EC<sub>50</sub>) del  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol sobre la corriente de sodio del hNav1.5.
- Determinar la relación corriente-voltaje, inactivación de estado estable, conductancia, recuperación de la inactivación y dependencia de uso frecuencia de la corriente de sodio del canal hNav1.5.
- Analizar los datos obtenidos y determinar el efecto del  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol sobre la I<sub>Na<sup>+</sup></sub>.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Descripción General**

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

- Amplificación y purificación del ADNc del canal hNav1.5.
- Obtención de ovocitos de rana *Xenopus laevis*.
- Expresión heteróloga del canal hNav1.5 en ovocitos de rana *Xenopus laevis*.
- Registro electrofisiológico de las células que han expresado el canal.
- Análisis estadístico de los datos obtenidos.

### **Técnicas y Procedimientos**

#### **Amplificación y purificación del ADNc del canal hNav1.5**

La amplificación del ADNc del canal hNav1.5 se llevó a cabo a partir de bacterias competentes One Shot® (ThermoFisher Scientific – Cat. 4040–10), es decir, con el gen de interés. El primer paso para la amplificación fue realizar un precultivo en medio LB-Broth para asegurar el crecimiento bacteriano; una vez asegurado un aumento en la población bacteriana, se procedió a realizar un cultivo masivo para posteriormente realizar la extracción del ADN mediante el kit Hi Speed Plasmid Midi (No. 12643, QIAGEN). Finalmente se determinó la identidad del ADNc obtenido y la concentración de este mediante espectrofotometría.

#### **Preparación del medio LB**

Se prepararon 350 ml de medio LB a razón de 20 g de cultivo por cada 1000 ml de agua tridestilada (7g para 350 ml). Se ajustó el pH del medio de cultivo a 7.30 con solución NaOH 1M. El medio de cultivo se esterilizó en una autoclave a 15 psi de presión durante 20 min.

## **Precultivo**

La preparación del precultivo se llevó a cabo bajo una campana de flujo laminar en condiciones estériles. En dos tubos Falcon de 15 ml se agregaron 3 ml de medio de cultivo LB, previamente esterilizado; y el antibiótico pertinente, para este caso: ampicilina a una concentración de 120 µg/ml. Posteriormente se agregaron 200 µl de bacterias con el ADNc de interés. Los cultivos se incubaron a 37°C en agitación constante de 170 rpm, durante 24 horas.

## **Cultivo Masivo**

Una vez que se determinó la viabilidad del precultivo, se colocaron 100 ml de medio LB en 3 matraces. Posteriormente a cada matraz se agregó ampicilina con la misma concentración que el precultivo, más 1 ml de precultivo que contiene las bacterias con el plásmido de interés. De igual manera, las bacterias se incubaron a 37°C durante 24 horas.

## **Purificación del ADNc**

Para extraer el ADN plasmídico del cultivo se utilizó el Kit Hi Speed Plasmid Midi (No. 12643, QIAGEN). El volumen de los matraces que contenían el cultivo masivo se repartió en 6 tubos de ensayo de 30 ml para ser centrifugados a 5000 rpm durante 8 min a una temperatura de 4°C. Posterior a la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y se agregó en cada tubo 6 ml de buffer de resuspensión; el contenido de los 6 tubos se colocó en uno solo y se agregaron 6 ml de buffer de lisis hasta obtener una suspensión de color azul.

Una vez completado el paso anterior, se agregaron 6 ml de buffer de neutralización y se mezcló por inversión hasta que el color azul desapareció, esta suspensión se transfirió a una jeringa con tapón y filtro, se dejó incubar a temperatura ambiente por 10 minutos. Durante este periodo de tiempo se equilibró la columna con 4 ml de buffer de equilibrio QBT y una vez pasaron los 10 minutos se removió la tapa del filtro Cartridge, se insertó el émbolo y se filtró el lisado bacteriano dentro de la columna Hi Speed Midi.

Se realizó un lavado de la columna con 20 ml de buffer QC y se recuperó el ADN atrapado en la resina de la columna con 5 ml de buffer de elusión QF en un tubo de 15 ml.

Se precipitó el ADN adicionando 3.5 ml de isopropanol al tubo con el filtrado, se agitó el tubo en un equipo vórtex y se incubó la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente. Durante la incubación se removió el émbolo de la jeringa de 20 ml y en su lugar se adaptó el filtro precipitador QIA Midi. Una vez transcurridos los 5 minutos se transfirió el contenido del tubo a la jeringa y se filtró aplicando una presión suave en el émbolo, se removió el filtro precipitador, se colocó nuevamente y se lavó con 2 ml de etanol al 70%.

De nueva cuenta se removió el filtro QIA Midi para retirar el émbolo de la jeringa y una vez más se colocó el filtro para introducir aire y secar el filtro.

En la jeringa de 5 ml se colocó el precipitador QIA Midi, agregando 500 µl de buffer TE, se colocó el émbolo y se recuperó el filtrado en con el ADN plasmídico ultrapuro en un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml. Este último paso se repitió 2 veces.

### **Comprobación del ADNc y determinación de la concentración**

La concentración del ADN obtenido se obtuvo mediante un espectofotómetro NanoDrop 2000 con absorbancias de 260 y 280 nm.

El patrón del ADN se realizó con el corte de una muestra del plásmido con la enzima de restricción BamHI, la enzima realiza 4 cortes en el plásmido generando 4 bandas con pesos moleculares de 6000, 2000, 1800 y 1500 pb. Se realizó electroforesis en un gel de agarosa al 8% en solución TBE 0.5X, 1 µl de bromuro de etilo como colorante; se corrieron 3 muestras en tres pozos diferentes de una cámara de electroforesis: ADN control, ADN cortado con BamHI y ADN marcador de peso molecular. La fuente de poder para la electrólisis se fijó a 100 V, 80 mA durante 30 minutos. Posterior a ese tiempo, el gel se observó en un transiluminador donde se compararon las muestras.

## Fármacos y Soluciones

### Fármacos

- THC A-D3 (THC-A-D3) SOLN 100#924; G/ML en Acetonitrilo. Sigma-Aldrich Co. S. Louis, MO.

### Soluciones

1. Solución OR-2 (en mM): NaCl 82.5; KCl 2.5; MgCl<sub>2</sub> 1; HEPES 5. pH 7.6.
2. Solución ND-96 (en mM): NaCl 96; KCl 2.5; MgCl<sub>2</sub> 1; CaCl<sub>2</sub> 1.8; HEPES 5; ácido pirúvico 5; teofilina 0.5; gentamicina 50 µg/ml. pH 7.6.
3. Solución para registro (en mM): NaCl 96; KCl 2.5; MgCl<sub>2</sub> 1, BaCl<sub>2</sub> 1, HEPES 5. pH 7.6.
4. Soluciones con THC: El THC fue tomado de una preparación stock y se diluyó en solución de registro hasta alcanzar las concentraciones deseadas. pH 7.6

## Metodología para la obtención de ovocitos

### Modelo

La rana *Xenopus laevis* es una especie endémica de Sudáfrica que en primera instancia sirvió como modelo de estudio para entender la fisiología muscular y renal, e incluso se ha utilizado para desarrollar herramientas de diagnóstico como pruebas de embarazo. En 1971 Gurdon y cols. utilizaron los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* para estudiar la expresión heteróloga de hemoglobina mediante la inyección de estas células con ARNm; desde entonces, los ovocitos de esta rana han sido apreciados en laboratorios donde las líneas de investigación se basan en el estudio de la función de las proteínas, por la relativa facilidad en el proceso de expresión y el bajo costo del procedimiento (Bhatt et al., 2022; Wagner, Friedrich, Setiawan, Lang, & Broer, 2000). La clasificación de Dumont permite agrupar a los

ovocitos del I al VI según su estado de maduración, siendo los más utilizados, los ovocitos en estados del IV al VI, debido a que han alcanzado un tamaño entre 1.1-1.3 mm con un contenido de aproximadamente 1  $\mu$ L y morfológicamente se pueden diferenciar perfectamente una región clara conocida como polo vegetal y una región oscura conocida como polo animal (Rasar & Hammes, 2006).

Una de las aplicaciones más fascinantes del estudio de proteínas expresadas en ovocitos, es el estudio de canales iónicos; el procedimiento consiste en la inyección de ARNm o ADNc para la expresión del canal deseado convirtiendo al ovocito en una célula capaz de responder a estímulos eléctricos. Con la ayuda de equipos de electrofisiología es posible realizar técnicas como el Patch-Clamp para estudiar las características biofísicas de los canales y las posibilidades se amplían cuando se hace interaccionar a los canales con otras sustancias o fármacos (Guan, Chen, & Zhang, 2013).

### **Anestesia**

Se seleccionó una rana *Xenopus laevis* (*Xenopus* 1; Ann Arbor, MI. USA) y se anestesió al colocarla en inmersión en una solución de ácido-3-amino-benzoico-etil-éster (Tricaina; 19 Sigma Chemical Co. S. Louis, MO) al 0.2%, durante 30 minutos; posteriormente se aseguró que la rana estuviera en anestesia profunda y se sometió a cirugía abdominal para remover los lóbulos ováricos que contienen a los ovocitos.

### **Cirugía**

Se realizó una incisión de aproximadamente 5 mm en los cuadrantes 7 o 9 del abdomen de la rana, la incisión se realizó por separado en los tres planos de tejido: piel, fascia y músculo. Una vez en la cavidad abdominal se removieron secciones de lóbulos ováricos cortando porciones de aproximadamente 1 cm. Una vez obtenido el volumen de células deseado, se procedió a cerrar con puntos de sutura los planos de tejido por separado. Se mantuvo a la rana sobre un bloque de

hielo para asegurar la anestesia por frío. La piel de la rana se mantuvo hidratada en todo momento durante la cirugía.

### **Proceso Enzimático**

Una vez cortados los lóbulos ováricos, se colocaron en un tubo de ensayo con colagenasa de *Clostridium histolyticum* (Colagenasa tipo 1A; Sigma Chemical Co. S. Louis, MO) a una concentración de 1.4 mg/ml, disuelta en solución OR-2. El tubo de ensayo se sometió a agitación mecánica durante dos periodos de 30 minutos cada uno y un tercer periodo de duración variable. Entre cada periodo de agitación se realizó un lavado con solución OR-2 para remover los desechos de la digestión enzimática y se renovó la solución con la enzima. Una vez finalizado el proceso enzimático, los ovocitos se colocaron en una caja Petri con solución ND-96 y se dejaron reposar a 4°C durante 12 horas antes de su manejo y selección.

### **Selección de ovocitos**

Se seleccionaron los ovocitos que cumplieran los siguientes criterios de inclusión: una forma esférica bien definida con una clara división entre los polos animal y vegetal, un tamaño de aproximadamente 1 mm de diámetro, que corresponde a los estadios V-VI en la escala de Dumont. Se seleccionaron grupos de entre 40 y 70 ovocitos para la inyección con ADNc.

## **Metodología para la expresión heteróloga del hNav1.5.**

### **Inyección de ovocitos**

Para la microinyección de los ovocitos se empleó un microinyector automático (Nanoliter 2000 Pump-head y Micto4™ pump controller, WPI, Sarasota, FL. USA). Los ovocitos que cumplieron los criterios de inclusión fueron inyectados con aproximadamente 30 nl de una dilución de ADNc que codifica para la subunidad  $\alpha$  del hNav1.5 y agua inyectable en una proporción 1:0.7. Para la inyección se utilizó una punta de borosilicato de 5-10  $\mu$ m, cargada con 5  $\mu$ l de ADNc + agua estéril. Posterior a la inyección, los ovocitos se incubaron a 18-20°C en solución ND-96

durante 18 a 48 horas, hasta el momento de su registro. El porcentaje de expresión de la proteína se evaluó de manera directa al momento del registro electrofisiológico al medir la amplitud de corriente de cada célula.

## **Metodología del registro electrofisiológico**

El registro electrofisiológico de los ovocitos se realizó con la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos; para visualizar a la célula y realizar la técnica de voltage-clamp, se utilizó un estereoscopio IROSCOPE® NZ-14T; para el registro de las corrientes de sodio ( $I_{Na^+}$ ), se utilizó un amplificador Warner OC-725C (Warner Instrument Corp., Hamden, CT. USA), controlado por el software pClamp 10.2 (Axon Instrument, Union City, CA, USA), a través de un convertidor analógico-digital de 16 bits Digidata 1440A (Axon Instrument, Union City, CA, USA.). Los electrodos de borosilicato (TW120F-6, WPI, Sarasota, FL, USA), se fabricaron en un puller modelo P-97(Sutter Instrument Co.); se llenaron con KCl 3M, alcanzando una resistencia final de entre 0.5 y 1.5 M $\Omega$ .

Durante la implementación de los protocolos experimentales se mantuvo un flujo constante de solución de registro en un cámara de aproximadamente 1.2 ml. Para la perfusión de la célula se utilizó un sistema de válvulas operadas desde la PC, a través de un circuito programable (Val-508®, CIDES Tecnología, Puebla. Pue. México). El sistema permitió una velocidad de perfusión de 1.5 ml/min, consiguiendo un recambio total de la solución de registro de la cámara en aproximadamente 1 minuto.

## **Criterios de inclusión y exclusión**

Sólo se registraron ovocitos con corrientes mayores a 1  $\mu$ A y menores a 6  $\mu$ A, y con una corriente de fuga menor a 0.1  $\mu$ A para reducir errores.

## Aplicación de THC

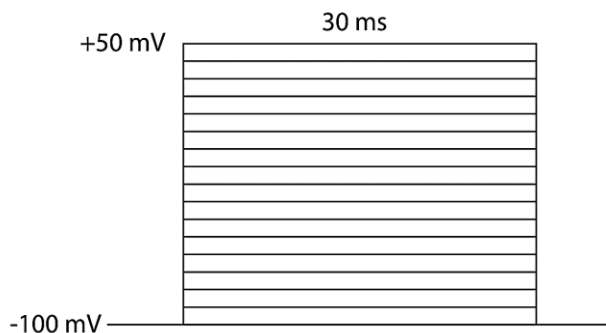
Los ovocitos que expresaron el canal  $hNav1.5$ , se registraron en tres condiciones diferentes: control, THC y lavado. En primer lugar, se aplicaron los protocolos experimentales en condición control, es decir, únicamente perfundidos por solución de registro; posteriormente se volvieron a registrar los protocolos en presencia de THC diluido en solución de registro; por último, se realizó un lavado del THC con solución de registro y se registraron una vez más los protocolos electrofisiológicos.

## Protocolos Experimentales

Para generar la corriente de sodio y estudiar los diferentes comportamientos del canal se implementaron los siguientes protocolos electrofisiológicos:

### Protocolo I. Relación Corriente - Voltaje (IV)

Partiendo de un potencial de reposo de  $-100$  mV se aplicaron pulsos despolarizantes con incrementos de  $10$  mV y una duración de  $30$  ms hasta alcanzar un máximo de  $+50$  mV. Para construir la gráfica de relación corriente-voltaje, se obtuvo la magnitud del pico máximo de corriente en cada paso de voltaje y se normalizó con el pico máximo de corriente obtenida en condiciones control. Los valores fueron graficados en función del potencial de membrana ( $E_m$ ). También se determinó el voltaje en el que se obtiene la máxima amplitud de corriente, para utilizarlo en protocolos posteriores, para este estudio fue cercano a los  $-30$  mV.



## Determinación de la concentración efectiva 50 (EC<sub>50</sub>)

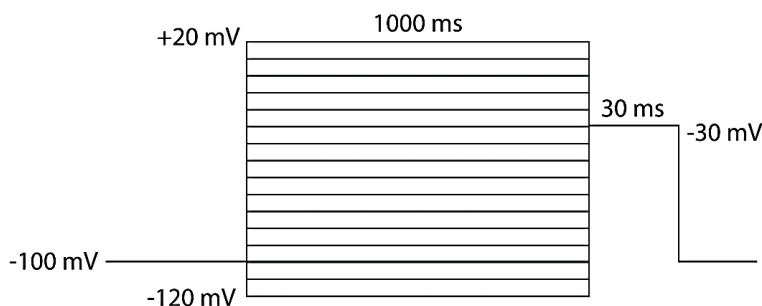
Para determinar la concentración de THC que provoca una disminución del 50% en la corriente entrante de sodio a través de los hNav1.5; se aplicaron diferentes concentraciones (1 μM, 3μM, 10 μM y 30 μM), los resultados se ajustaron con la ecuación de Hill:

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

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

### Protocolo II. Inactivación de estado estable

Para analizar la inactivación del estado estable se utilizó un protocolo de doble pulso; partiendo de un potencial de -100mV se aplicaron pulsos condicionantes con duración de 1 segundo (1000 ms) desde -120 mV a +20 mV con incrementos de +10 mV, posteriormente se aplicó el pulso de voltaje de prueba el que se observó la máxima corriente durante el protocolo de relación corriente-voltaje, con una duración de 30 ms.



Para construir el gráfico de esta relación, se midió la amplitud de la corriente al pico inducida por el pulso de voltaje de prueba, se graficó en función del potencial

de membrana del pulso condicionante; posteriormente se normalizaron los datos y se ajustaron utilizando la ecuación de Boltzmann:

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

Donde:

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

$k$ : pendiente

$A_1$ : Amplitud

$A_2$ : Amplitud del componente cuando no inactiva

### **Protocolo III. Conductancia del canal**

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en el protocolo I, se determinó la conductancia del canal de sodio dependiente de voltaje. Los datos graficados se obtuvieron mediante la siguiente ecuación:

$$G_{Na^+} = I_{Na^+} / (E_m - E_{Na^+})$$

Donde:

$G_{Na^+}$ : Conductancia del ion sodio

$I_{Na^+}$ : Amplitud de la corriente a cada valor del potencial de membrana

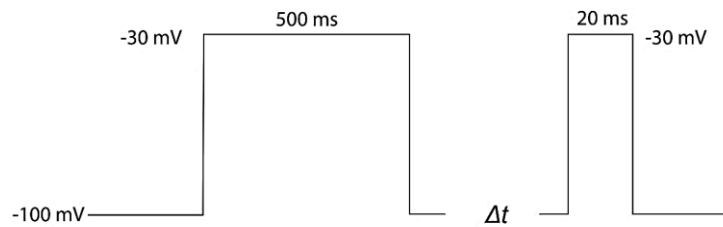
$E_m$ : Potencial de membrana

$E_{Na^+}$ : Potencial de equilibrio del sodio.

Los datos obtenidos, fueron normalizados con relación a la conductancia máxima observada ( $G_{max}$ ) y posteriormente se ajustaron con la ecuación de Boltzmann.

### **Protocolo IV. Recuperación de la inactivación**

Para este protocolo primero se inactivó la  $I_{Na^+}$  con la aplicación de un pulso condicionante de 500 ms a -20 mV desde un potencial de sostenimiento de -100 mV, para después regresar al potencial de sostenimiento durante diferentes intervalos de tiempo de duración variable ( $\Delta t = 1-10000$  ms). Posteriormente se aplicó un pulso de prueba en el que se fijó el voltaje en el que se observó el pico de corriente máxima en el protocolo I, durante 20 ms.



Para obtener el curso temporal de la recuperación de la inactivación se midió la relación de la  $I_{Na^+}$  generada por el pulso de prueba ya la  $I_{Na^+}$  consecuencia del pulso condicionante, esta relación se graficó en función del tiempo.

Los datos obtenidos, se normalizaron y posteriormente se ajustaron utilizando una ecuación de doble exponencial como se muestra a continuación:

$$f = y_0 + A_1 e^{-x/t_1} + A_2 e^{-x/t_2}$$

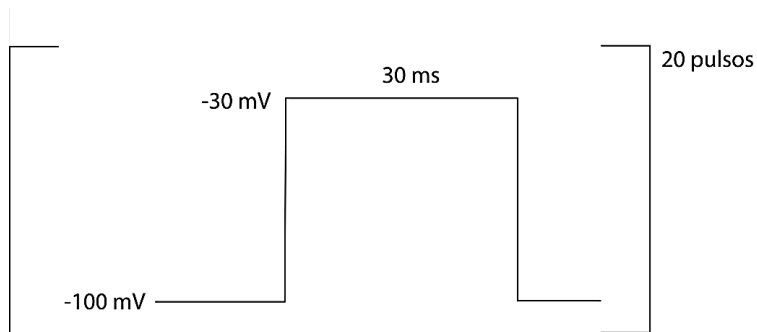
Donde:

$A_1$  y  $A_2$ : Son amplitudes

$t_1$  y  $t_2$ : Son los componentes rápido y lento de la constante de tiempo de recuperación de la inactivación, respectivamente.

### Protocolo V. Dependencia de uso y frecuencia

Esta propiedad del canal de sodio se estudió con un protocolo de trenes de estimulación de 20 pulsos partiendo de un potencial de -100 mV y una duración de 30 ms al pulso de voltaje donde se observó el pico de corriente máximo. Los trenes de estimulación se aplicaron a 1 Hz, 2 Hz, y 5 Hz.



Para analizar el bloqueo dependiente de la frecuencia se midió la relación entre la  $I_{Na}$  generada en el pulso 20 y la obtenida en el pulso 1 del tren de estimulación.

## Protocolo VI. Curso Temporal

Para este protocolo se utilizaron pulsos cuadrados de 30 ms a partir de un potencial de sostenimiento de -100 mV al pulso de voltaje donde se observó el pico de corriente máximo. Los pulsos se aplicaron cada 10 segundos.

## Análisis estadístico

Todos los resultados se presentan como la media de los datos  $\pm$  el error estándar de la media, para evaluar la significancia entre los resultados de los registros, se utilizó la prueba *t-Student* pareada. Se consideró una diferencia significativa cuando  $p < 0.05$ .

Los registros fueron obtenidos con el programa computacional pClamp 10.6 (Axon Instruments, LLC, CA, USA), la extracción de datos a partir de los registros se realizó con el software Clampfit 10.6 (Axon Instruments, LLC, CA, USA). Para la obtención de las gráficas, el análisis estadístico y los ajustes se utilizaron las aplicaciones OriginPro 9.1 (OriginLab Corp. Northampton, MA, USA) y SigmaPlot 12.5 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## **Bioética**

El manejo y los procedimientos realizados en las ranas *Xenopus laevis* se llevaron a cabo conforme a lo estipulado en la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y uso de animales de laboratorio, del consejo mexicano para el cuidado de animales (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).

## RESULTADOS

### Bloqueo dependiente de concentración

Para determinar el efecto de la concentración de THC sobre el bloqueo de los canales de sodio hNav1.5 se realizó una curva dosis-efecto. Las concentraciones de prueba utilizadas fueron 1, 3, 10 y 30  $\mu\text{M}$  de THC. El bloqueo de los canales se cuantificó en función a la disminución del pico de corriente entrante de sodio ( $I_{\text{Na}^+}$ ). En la tabla 3 se puede apreciar el porcentaje de bloqueo obtenido por la administración de THC a diferentes concentraciones de fármaco probadas en un número concreto de células.

Concentración de THC ( $\mu\text{M}$ )	Porcentaje de bloqueo $\pm$ error estándar de la media	<i>n</i>
1	12.64% $\pm$ 1.7420	4
3	31.1786% $\pm$ 3.0890	4
10	52.9518 $\pm$ 5.5320	7
30	99.500 $\pm$ 0.2890	4

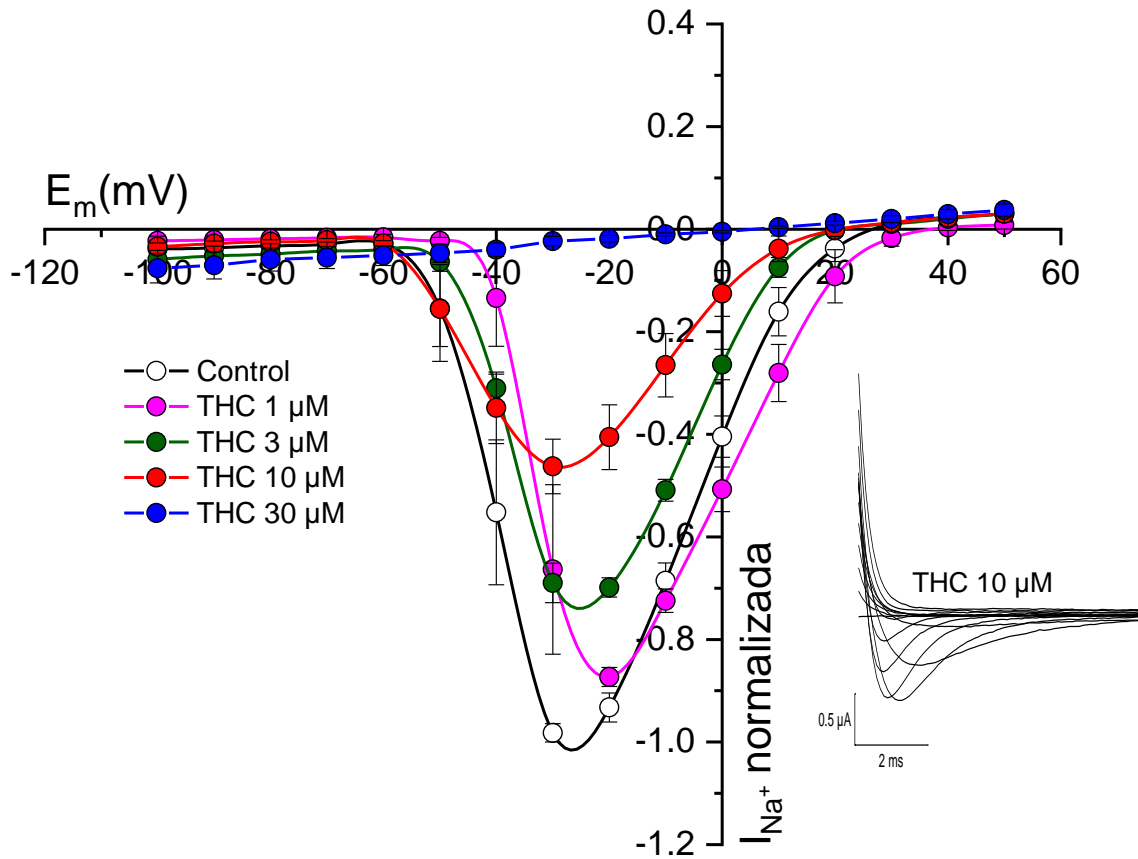
*Tabla 3. Porcentaje de bloqueo en relación con la concentración de THC. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  el error estándar.*

En la gráfica 1, se presenta la familia de curvas corriente contra voltaje, para el canal hNav1.5, obtenidas por la administración de las diferentes concentraciones de THC; mientras que, en la gráfica 2, se aprecia la fracción de corriente bloqueada en función a la concentración de THC y con respecto al valor control. En la gráfica 3 los mismos datos se ajustaron mediante la ecuación de Hill ( $R^2=0.9776$ ) con la que se obtuvo la  $EC_{50}$ , que para este caso, tiene un valor de  $8.3 \mu\text{M} \pm 3.9$ , el coeficiente de Hill es de  $1.1403 \pm 0.4936$  para una relación estequiométrica de prácticamente 1 a 1. Se obtuvo por medio de la prueba *t-Student*, la significancia entre los valores obtenidos para cada concentración de THC, obteniendo una  $p=0.0053$  entre la concentración de  $1\mu\text{M}$  y  $3\mu\text{M}$ ,  $p=0.0057$  entre la concentración de  $3\mu\text{M}$  y  $10\mu\text{M}$  y  $p=0.00014$  entre la concentración de

10 $\mu$ M y 100 $\mu$ M. Con estos valores, se demuestra que el THC tiene un efecto dependiente de la dosis.

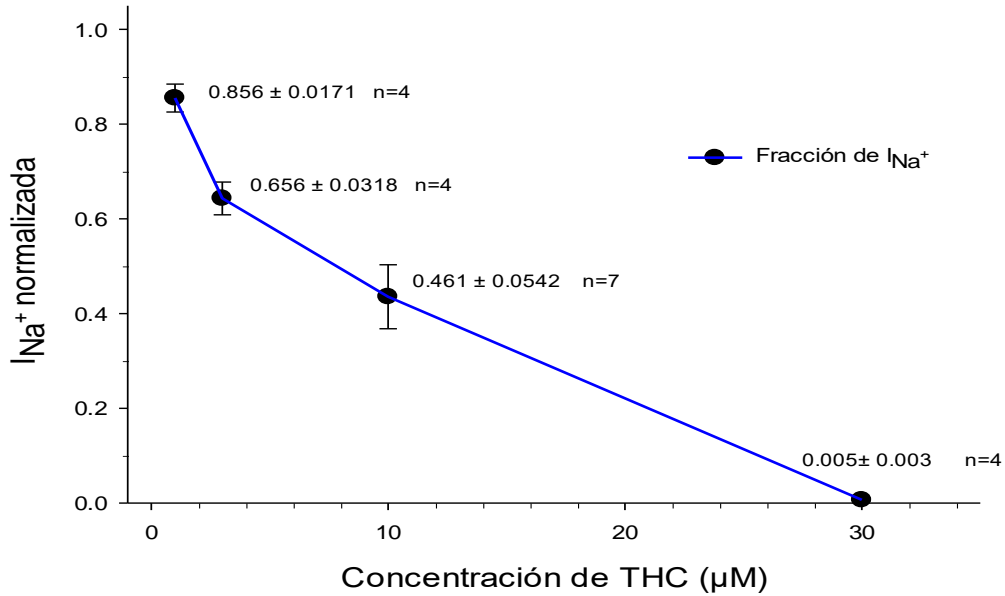
Para el resto de los protocolos electrofisiológicos se utilizó una concentración de THC de 10 $\mu$ M.

### Relación I-V del canal hNa<sub>v</sub>1.5



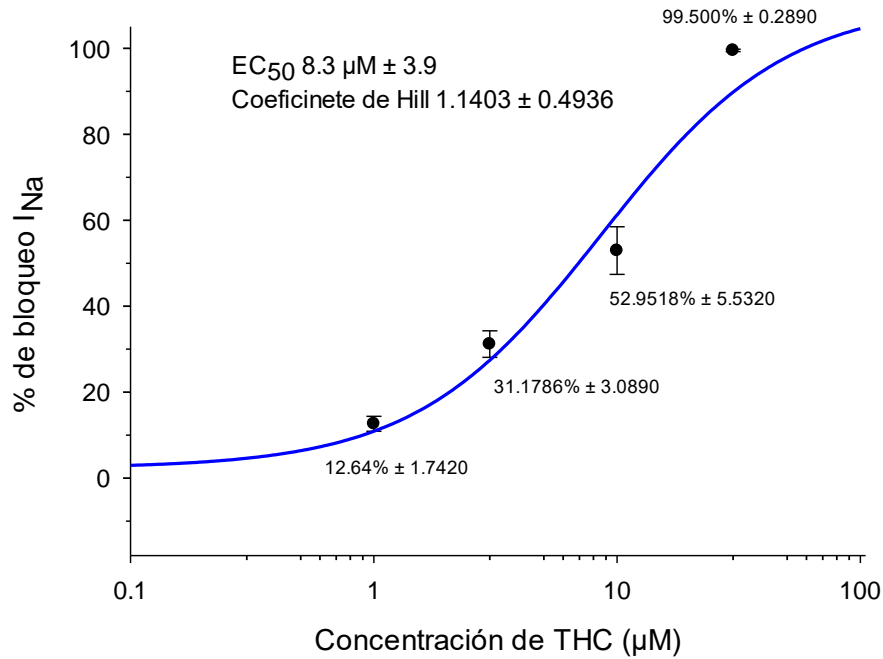
Gráfica 1: Relación corriente contra voltaje del canal hNa<sub>v</sub>1.5, en condiciones control y a las concentraciones mostradas en el gráfico. Los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar de la media.

### Bloqueo de corriente dependiente de concentración



Gráfica 2: Efecto en el pico de la corriente de sodio en función de la concentración de THC. Los datos representan la fracción de corriente de sodio en el canal  $hNa_v1.5$ .

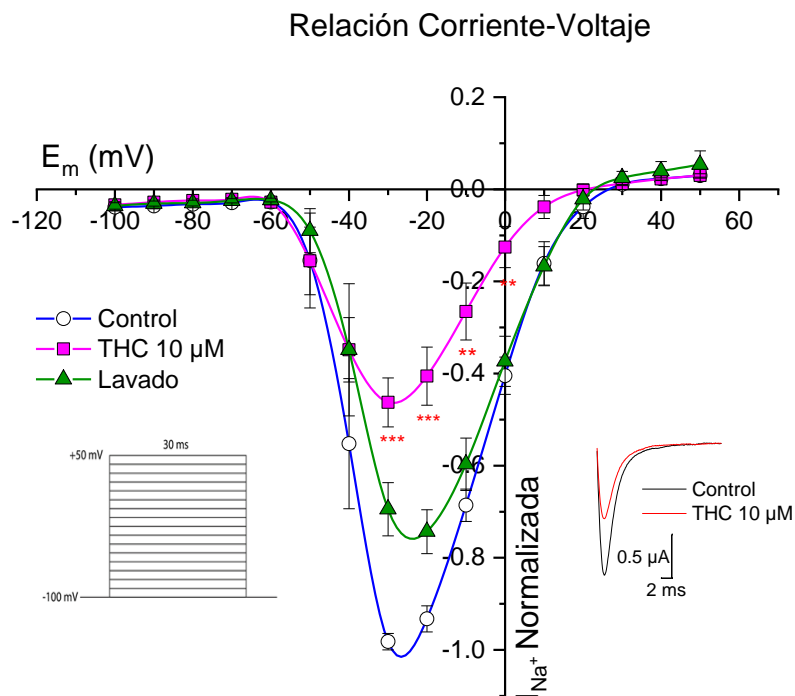
### Bloqueo dependiente de concentración THC



Gráfica 3: Curva dosis-efecto. Los datos se representan como el porcentaje de bloqueo de la  $I_{Na^+}$  del canal  $hNa_v1.5$  en función de la concentración de THC (1, 3, 10 y 30  $\mu M$ ). Los datos fueron ajustados por una ecuación de Hill de 4 parámetros, obteniendo la siguiente información.  $EC_{50}$ :  $8.3 \mu M \pm 3.9$ , coeficiente de Hill:  $1.1403 \pm 0.4903$ .  $R^2=0.9776$

## Relación Corriente contra voltaje

La gráfica 4 de relación corriente voltaje, demuestra que en ausencia del fármaco y en condiciones control, el hNav1.5 comienza a activarse a partir de los -50 mV, el pico de corriente se alcanza aproximadamente a los -30 mV y el potencial de inversión se encuentra alrededor de +30 mV. En la gráfica también se puede apreciar que con la aplicación de 10  $\mu\text{M}$  de THC se produce una reducción de aproximadamente el 50% del pico de la  $I_{\text{Na}^+}$ , el análisis de los datos demuestra que no se modifican de forma significativa el  $E_m$  para la activación del canal, el pico de corriente o la inversión. El cambio más significativo entre la amplitud de la corriente se obtuvo desde los -30 mV y hasta los 0 mV (\*\* $p < 0.005$  y \*\*\* $p < 0.0001$ ). Al aplicar un lavado de las células con solución de registro, se observó después de 15 minutos, que el canal recupera casi al 80% de la corriente inicial, sin cambios significativos en los parámetros ya descritos.

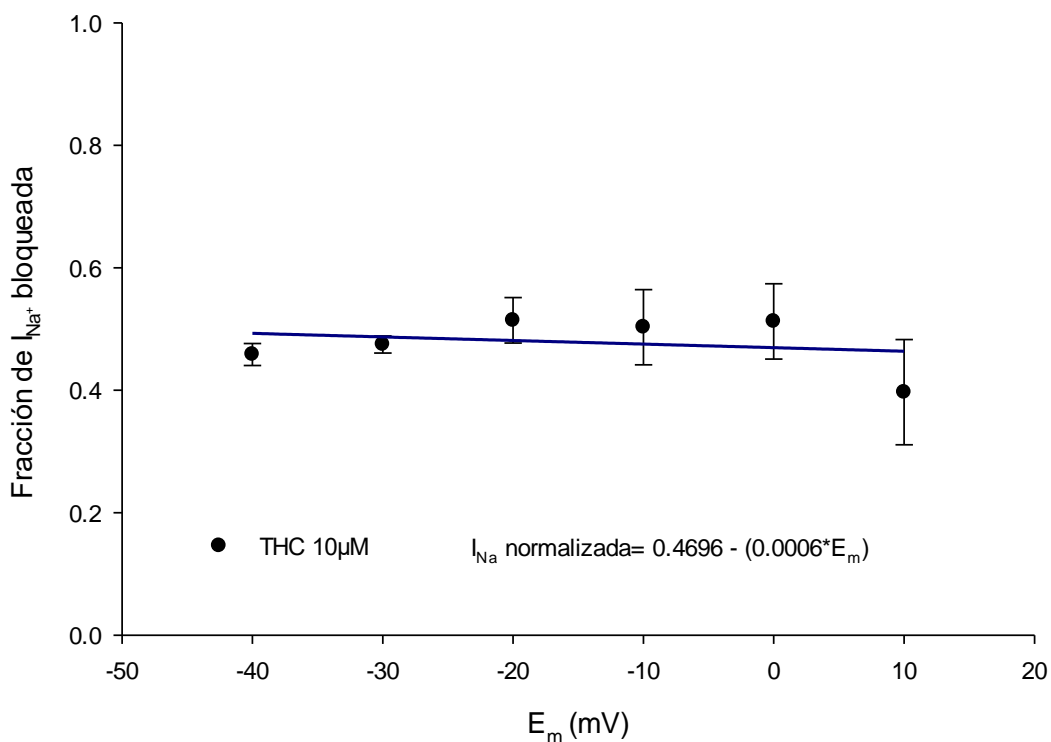


Gráfica 4: Relación corriente contra voltaje del canal de hNav1.5 en condiciones control y en presencia de 10  $\mu\text{M}$  de THC. La gráfica fue construida utilizando el protocolo que se muestra a la izquierda. Se puede apreciar que el THC no modifica el potencial de membrana para la activación, el pico de corriente y la inversión. Se observa que los cambios en la amplitud de la corriente se dan de -30 a 0 mV. Después de aplicar un lavado, la corriente se recupera al 80% de la corriente control, sin modificaciones en los parámetros dependientes de voltaje.

## Dependencia de voltaje

Para determinar si la acción del THC está relacionada con los cambios en el potencial de membrana, se calculó la proporción de corriente bloqueada con la sustancia en el rango de -40 a +10 mV. En la gráfica 5 se puede apreciar como la proporción de bloqueo de corriente se mantiene relativamente constante en los diferentes valores de potencial de membrana. Los datos se ajustaron con una ecuación de la recta de tipo  $y = y_0 + mx$ ; donde  $m$  es el valor de la pendiente, que para este caso en particular es un valor cercano a cero ( $m = 0.0006$ ), lo que significa que el THC no ejerce bloqueo dependiente de voltaje.

### Bloqueo dependiente de Voltaje



Gráfica 5. Bloqueo dependiente de voltaje. Se muestra la fracción de bloqueo de la corriente de sodio al aplicar 10  $\mu M$  de THC en un rango de -40 a +10 mV. Se muestra en color azul la ecuación de la recta obtenida por regresión lineal, se puede observar que la pendiente es prácticamente cero.

## Inactivación de estado estable y conductancia

Para analizar el efecto del THC sobre la inactivación de estado estable se utilizó un protocolo de doble pulso como se muestra en la gráfica 6 y se describe en el apartado de materiales y métodos. Para graficar los resultados se midió el pico de corriente provocado por un pulso de prueba y se graficó en función del  $E_m$  del pulso condicionante. Los datos obtenidos se normalizaron y se ajustaron con la ecuación de Boltzmann:

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

Los parámetros obtenidos con el ajuste se muestran en la tabla 4. Se obtuvo una  $R^2$  para los ajustes con la ecuación de Boltzmann en tratamiento de 0.9994 para la curva de inactivación y de 0.9996 para la conductancia.

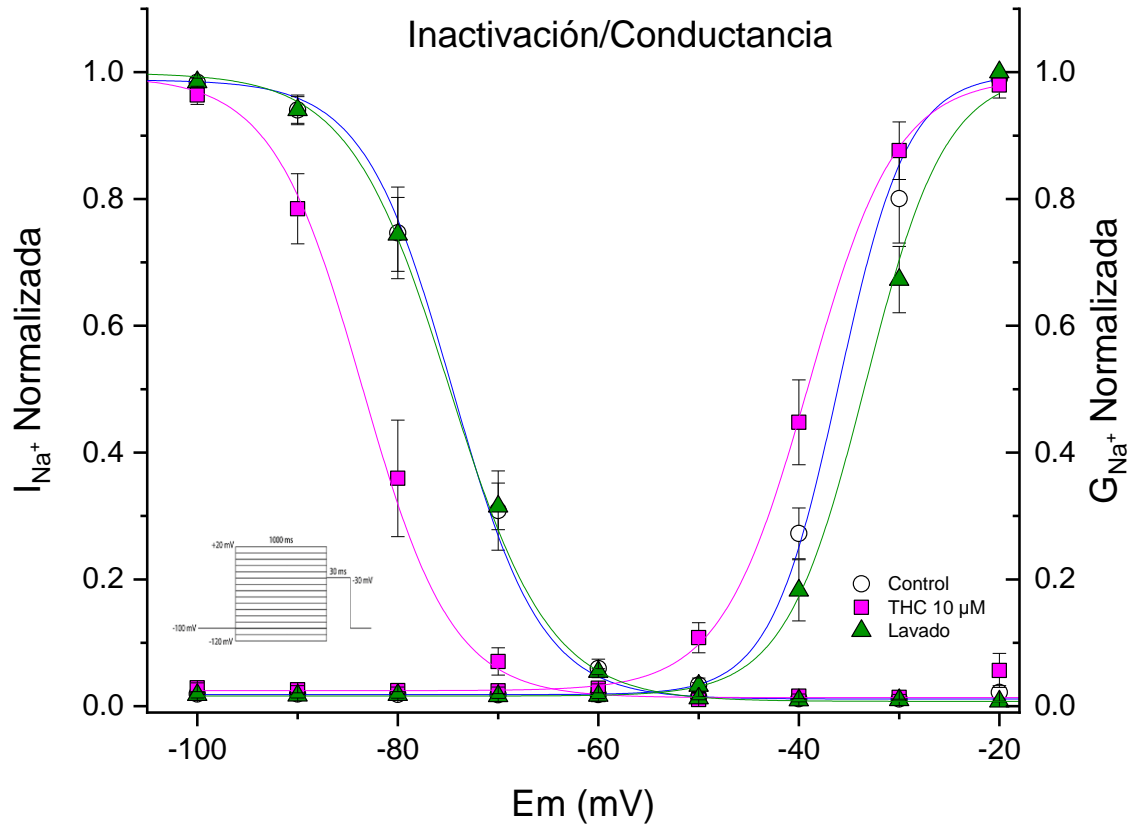
En la gráfica 6 se puede observar que el THC desplazó de forma significativa ( $p < 0.05$ ) la curva de inactivación ( $\sim 10$  mV) hacia valores más negativos o hiperpolarizantes sin modificar la pendiente. Después de el lavado de la sustancia, los valores de la inactivación de estado estable regresaron a las condiciones control.

Los efectos del THC sobre la conductancia de  $\text{Na}^+$  ( $G_{\text{Na}^+}$ ) se obtuvieron a partir los datos obtenidos en relación corriente contra voltaje, se calculó la conductancia célula a célula utilizando utilizando su potencial de inversión ( $E_{\text{Na}^+}$ ), a través de la ecuación:

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

Los valores obtenidos se normalizaron respecto a la conductancia máxima ( $G_{\text{max}}$ ) y ajustados con la ecuación de Boltzmann. Los parámetros obtenidos con el ajuste se muestran en la tabla 4.

El THC no provoca cambios significativos en la curva de conductancia, tampoco modifica la pendiente. Con el lavado de la sustancia, la célula regresó a las condiciones control.



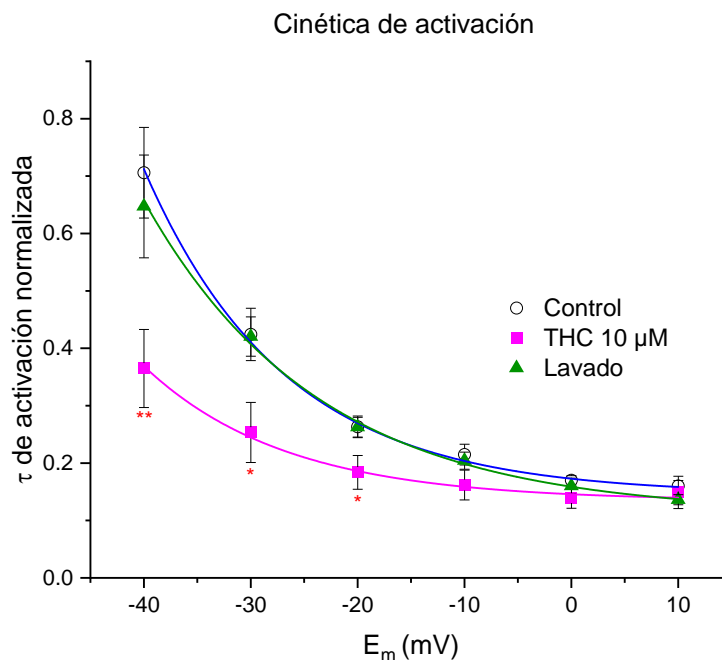
Gráfica 6. Curva de inactivación de estado estable y conductancia del  $hNav1.5$  en condiciones control, con  $10 \mu M$  de THC y después del lavado. Se puede observar un desplazamiento a valores hiperpolarizantes de la curva de inactivación de  $-74.56 \pm 1.9969$  mV a  $-83.5515 \pm 2.4079$  mV). En el resto de los parámetros no hubo cambios significativos. En el inserto de la gráfica se puede observar el protocolo utilizado para obtener la curva de inactivación del estado estable.

	Inactivación		Conductancia	
	$V_{1/2}$ (mV)	$k$	$V_{1/2}$ (mV)	$k$
<b>Control</b>	$-74.56 \pm 1.9969$	$4.4307 \pm 0.5881$	$-36.01 \pm 0.4385$	$3.4193 \pm 0.1560$
<b>THC <math>10 \mu M</math></b>	$-83.5515 \pm 2.4079^*$	$4.4761 \pm 0.8192$	$-39.0131 \pm 0.4831$	$4.3876 \pm 0.2491$
<b>Lavado</b>	$-74.88 \pm 0.9460$	$4.9911 \pm 0.3424$	$-33.3615 \pm 0.4516$	$4.3625 \pm 0.3251$

Tabla 4. Parámetros de inactivación de estado estable y conductancia del canal  $hNav1.5$  en condiciones control,  $10 \mu M$  de THC y lavado. Estos valores fueron obtenidos después de realizar el ajuste con la ecuación de Boltzmann. Los datos se presentan como la media  $\pm$  el error estándar de la media. Obsérvese el desplazamiento significativo del  $V_{1/2}$  de la inactivación hacia valores hiperpolarizantes ( $p < 0.05$ ). En el resto de los parámetros no hubo cambios estadísticamente significativos.

## Cinética de activación

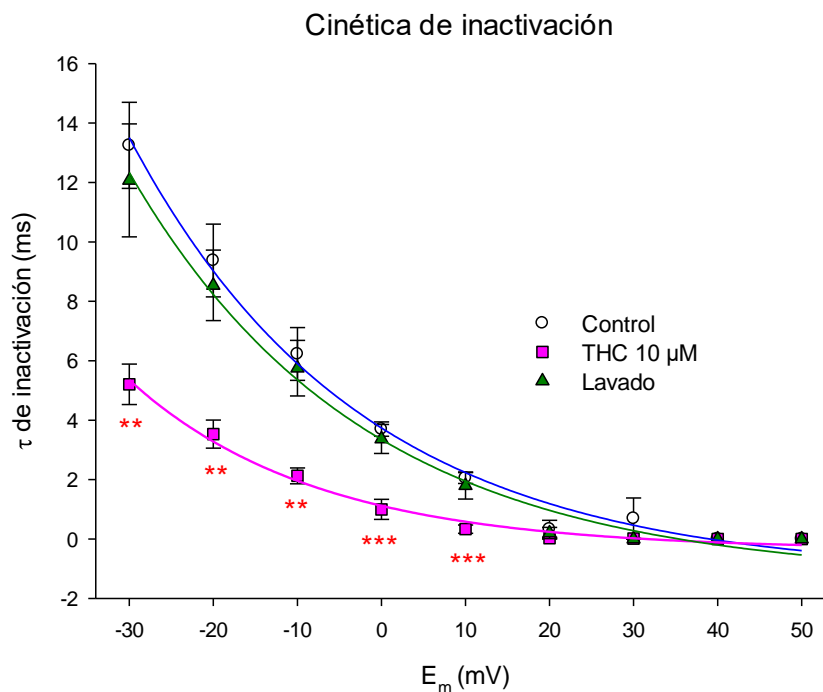
Para evaluar el crecimiento de la corriente de sodio, se contabilizó el tiempo requerido para alcanzar los picos de corriente para cada paso de voltaje, los datos se obtuvieron del protocolo de activación (empleado para construir la relación corriente contra voltaje); en condiciones control, en presencia de 10  $\mu\text{M}$  de THC y después del lavado. Los datos obtenidos se normalizaron respecto al tiempo máximo y se ajustaron con una ecuación monoexponencial (Control  $R^2=0.9927$ , THC 10  $\mu\text{M}$   $R^2=0.9818$  y lavado  $R^2=0.9951$ ); se calculó la constante de activación ( $\tau$ ) para cada condición (control  $9.12 \pm 0.71$ ; THC 10  $\mu\text{M}$   $9.18971 \pm 1.4583$ ; lavado  $11.30617 \pm 0.93454$ ). En la gráfica 7 se muestra que existe una diferencia significativa (\*\* $p<0.01$  \* $p<0.05$ ) en la constante de activación ( $\tau$ ) desde los -40 y hasta los -20 mV lo que indica una aceleración en la activación del canal cuando los canales interactúan con el THC.



Gráfica 7. Cinética de activación del canal  $hNa_v1.5$ . Se puede observar la relación entre el potencial de membrana y la constante de activación den condiciones control, después de aplicar 10  $\mu\text{M}$  de THC y posterior al lavado. Los datos muestran una disminución significativa en la constante de activación, desde los -40 y hasta los -20 mV cuando los canales interactúan con 10  $\mu\text{M}$  de THC. (\*\* $p<0.01$  \* $p<0.05$ )

## Cinética de inactivación

La cinética de inactivación se obtuvo midiendo el tiempo transcurrido desde el pico de corriente hasta el punto donde la corriente se hizo cero. Los datos se obtuvieron con el protocolo de corriente contra voltaje. En la gráfica 8 se muestra la constante de tiempo  $\tau$  en función del potencial de membrana  $E_m$ , tanto en condiciones control, en presencia de 10  $\mu\text{M}$  de THC y posterior a un lavado. Los datos se ajustaron con una ecuación monoexponencial. Los resultados sugieren que en presencia de THC el proceso de inactivación se vuelve más rápido, comparado con el control, desde los -30 y hasta los +10 mV, teniendo una significancia mayor en 0 y 10 mV ( $p < 0.001$ ). Desde los +20 y hasta los +50 mV no hay diferencias significativas.



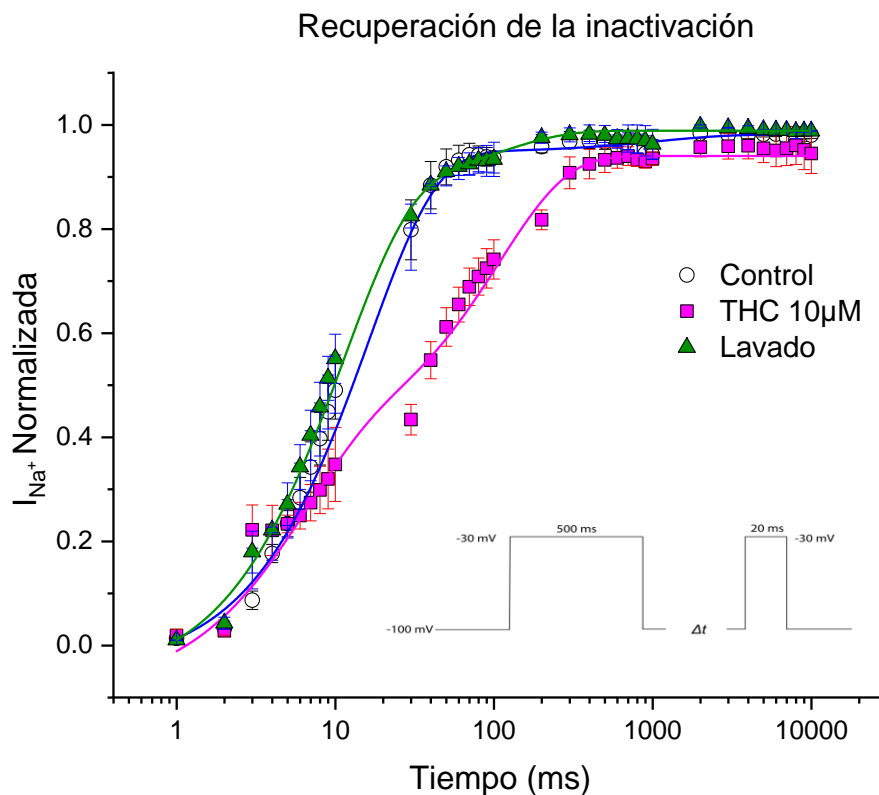
Gráfica 8. Cinética de inactivación. Es posible apreciar que la inactivación se acelera de manera significativa (\*\* $p < 0.005$  y \*\*\* $p < 0.001$ ), desde los -30 y hasta los 10 mV. Los datos se ajustaron una ecuación monoexponencial ( $R^2 = 0.9925$  control,  $R^2 = 0.9899$  THC 10  $\mu\text{M}$  y  $R^2 = 0.9914$  lavado). Desde los +20 mV y hasta los +50 mV no hay diferencias significativas.

## Curso temporal de la recuperación de la inactivación

El THC en una concentración de 10  $\mu\text{M}$  ha demostrado provocar un enlentecimiento significativo en la recuperación de la inactivación (Gráfica 9). Los valores obtenidos con el protocolo de recuperación de la inactivación, descrito en el apartado de materiales y métodos, se ajustaron con una ecuación doble exponencial del tipo:

$$f = y_0 + A_1 e^{-x/t_1} + A_2 e^{-x/t_2}$$

Donde  $x$  es el tiempo que transcurre entre el pulso condicionante y el pulso de prueba;  $t_1$  y  $t_2$  son las constantes de tiempo la recuperación rápida y lenta, respectivamente. Los valores se muestran en la tabla 5.



Gráfica 9. Curso temporal de la recuperación de la inactivación. Los datos se ajustaron con una ecuación doble exponencial (Control  $R^2=0.99972$ , THC 10  $\mu\text{M}$   $R^2=0.99632$ , lavado  $R^2=0.9999$ ). Se puede observar una disminución estadísticamente significativa en la recuperación de la inactivación con THC 10  $\mu\text{M}$   $p<0.005$ . El inserto corresponde al protocolo utilizado para la obtención de los datos de esta curva.

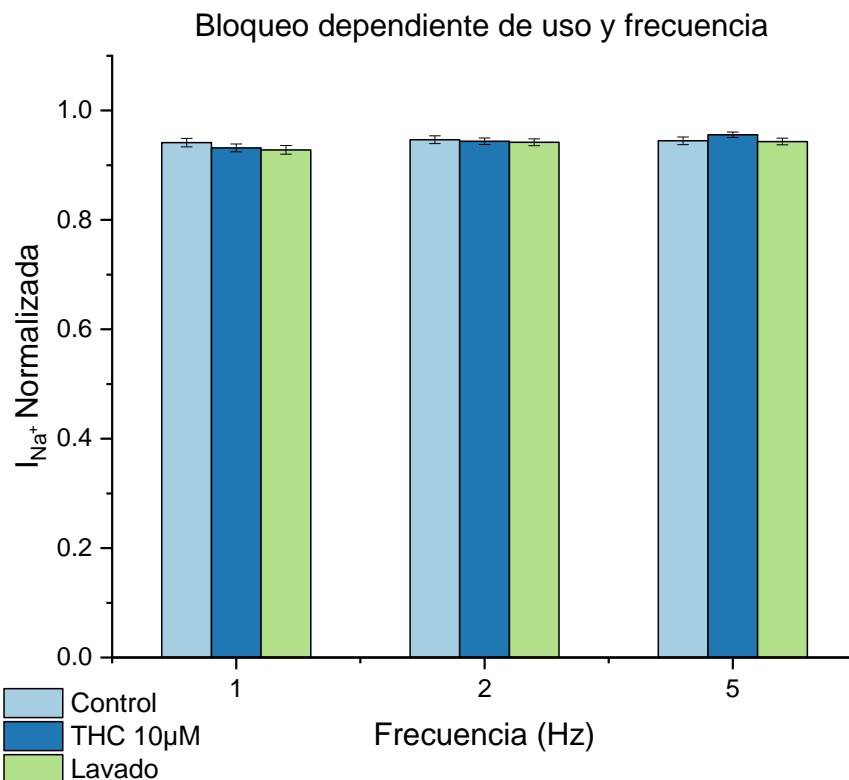
Condición	A <sub>1</sub>	t <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	t <sub>2</sub>
Control	-0.471 ± 0.0480	5.8776 ± 1.1605	-0.5588 ± 0.0500	107.6160 ± 15.9988
10 μM THC	-0.9912 ± 0.0009**	13.9708 ± 1.5714**	-0.110 ± 0.0376	126.6852 ± 47.5397
Lavado	-0.9442 ± 0.04042	10.8973 ± 0.8596	-0.1182 ± 0.4214	103.5824 ± 72.6937

*Tabla 5. Recuperación de la inactivación. Se muestran las constantes de tiempo t<sub>1</sub> y t<sub>2</sub> para la recuperación rápida y lenta en las tres condiciones. Control, THC 10 μM y lavado. El resultado del análisis estadístico demuestra que existe una significativa en la constante de tiempo rápida de la recuperación de la inactivación con 10 μM de THC. Nótese también, el cambio significativo en el componente A1. \*\*p<0.05.*

### **Bloqueo dependiente de uso y frecuencia**

Para obtener estos resultados se aplicó un tren de 20 pulsos a frecuencias de 1,2 y 5 Hz. Se midió la proporción de corriente generada en el pulso 20 y se comparó con la obtenida en el pulso 1. En la gráfica 10, se presentan los resultados de dicho experimento, en condiciones control, con la administración de 10 μM de THC y después del lavado. Para la frecuencia de 1 Hz, la disminución registrada en condiciones control fue de 6% ± 0.00783, en presencia de 10 μM de THC la disminución fue del 7% ± 0.9317 y después del lavado 7% ± 0.00799. Para la frecuencia de 2 Hz, en condiciones control, la corriente disminuyó 5% ± 0.00704, en presencia de 10 μM de THC la disminución fue del 6% ± 0.00583 y en lavado 6% ± 0.00625. En la frecuencia de 5 Hz en condiciones control se provocó una disminución del 6% ± 0.00697, en presencia de 10 μM de THC la disminución fue del 4% ± 0.00492, y en lavado 6% ± 0.00617.

Posterior a la aplicación de las pruebas estadísticas se determinó que no existe diferencia significativa entre los datos arrojados por los protocolos.

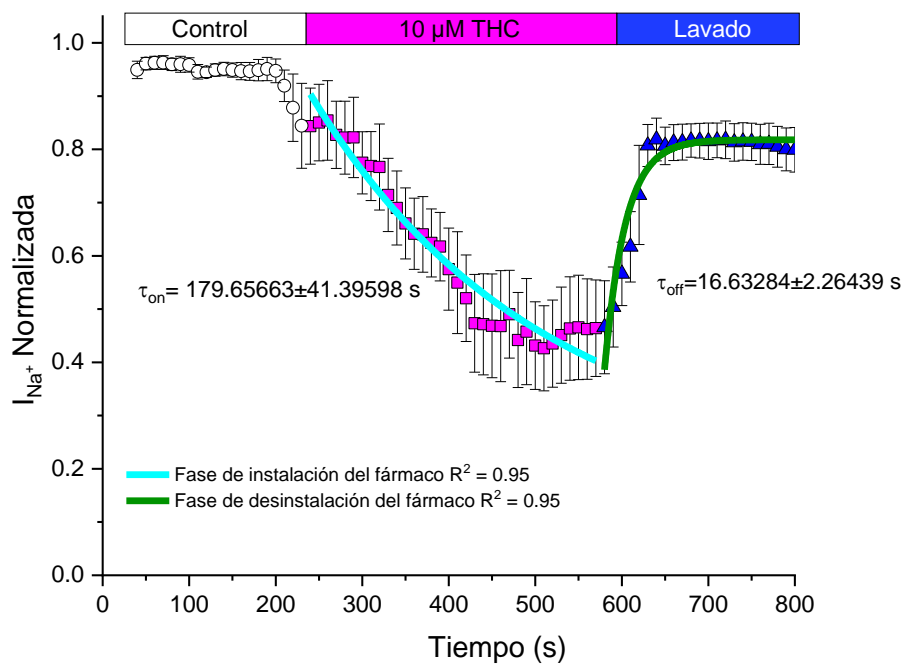


*Gráfica 10. Bloqueo dependiente de uso y frecuencia. Se compara el efecto de bloqueo de la corriente de sodio en condiciones control, en presencia de 10 µM de THC y después de lavado; en diferentes frecuencias (1, 2 y 5 Hz). En ninguno de los casos se obtuvo una diferencia significativa.*

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

Para determinar el curso temporal de la inhibición de la corriente de sodio se aplicaron pulsos cuadrados a un potencial de -30 mV desde un potencial de sostenimiento de -100 mV, cada pulso espaciado 5 segundos, mientras se perfundía fármaco hasta alcanzar la estabilización de la corriente. Posteriormente se realizó un lavado con solución de registro. Antes de la perfusión con THC se aplicó el protocolo en condiciones control durante 3 minutos. En la gráfica 11 se muestra la relación corriente vs tiempo, los datos se ajustaron con una ecuación monoexponencial de tipo  $y = y_0 + Ae^{-t/\tau}$ . Con el ajuste se determinó las constantes de tiempo para la instalación del fármaco, que en este caso fue de 179.65 s y de 16.63 s para la disociación del fármaco.

### Curso temporal del efecto del THC 10 $\mu$ M



Gráfica 11. Curso temporal de la instalación y disociación del THC. Se utilizó la concentración de 10  $\mu$ M de THC. Los datos se ajustaron con una ecuación monoexponencial simple, tanto en la fase de instalación (línea azul) y a fase de lavado (línea verde). Se calcularon las constantes de tiempo  $\tau_{on} = 179.65 \pm 41.39$  s y  $\tau_{off} = 16.63 \pm 2.26$  s

## DISCUSIÓN

La presente investigación ha demostrado que el THC suprime las corrientes de sodio del canal hNav1.5 de forma dependiente a la concentración, con una  $EC_{50}$  de  $8.3 \pm 3.9 \mu\text{M}$ . Este tipo de bloqueo dependiente de concentración con concentraciones medias por debajo de los  $20 \mu\text{M}$  se ha descrito antes con diferentes cannabinoides; Okura y colaboradores encontraron que la AEA suprime las corrientes de sodio en las isoformas Nav1.2 y 1.6 con  $EC_{50}$  de 17 y 12  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Okura et al., 2014). Foadi y colaboradores, encontraron que el ácido ajulémico (un derivado sintético del THC) produce una disminución de las corrientes de sodio en las isoformas Nav1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.7, y 1.8 con concentraciones entre 2.9 y 9.3  $\mu\text{M}$  (Foadi et al., 2014).

Comparando los efectos en la relación corriente contra voltaje; en condiciones control, nuestros resultados muestran que el canal hNav1.5 comienza a activarse a los -50 mV, teniendo el pico de corriente en -30 mV, estos resultados son compatibles con lo reportado por Moreau y su equipo en un reporte de las propiedades biofísicas del hNav1.5 (Moreau et al., 2018). Con la aplicación de THC no se evidenciaron cambios significativos en los potenciales de membrana para la activación del canal, el pico de corriente máximo ni el potencial de inversión de la corriente; resultados similares fueron presentados por diferentes autores y con diferentes cannabinoides (Foadi et al., 2014; Ghovanloo et al., 2018; Okura et al., 2014). También se puede ver que el THC provoca bloqueo de la corriente, de forma no dependiente al potencial de membrana.

El efecto del THC sobre la curva de inactivación/conductancia se ve reflejado únicamente en el desplazamiento de la curva de inactivación hacia valores más negativos, conservando la conductancia cercana a los valores control; este efecto también ha sido planteado con anterioridad (Al Kury, Voitychuk, Yang, et al., 2014; Foadi et al., 2014; Ghovanloo et al., 2018; Okura et al., 2014). Los valores en condiciones control para el hNav1.5 en nuestros experimentos muestran un  $V_{1/2}$  de inactivación de -74.56 mV y de -36.01 mV para la conductancia. En el potencial de

acción cardíaca, la inactivación de los canales de sodio es un componente muy importante que permite la repolarización de la membrana plasmática; la inactivación provoca una menor disponibilidad de los canales para que puedan conducir iones de  $\text{Na}^+$ ; el corrimiento de la curva hacia valores hiperpolarizantes, entonces, hace que los canales se inactiven a valores más cercanos al potencial de reposo, evitando la generación de potenciales de acción prematuros y teniendo un efecto antiarrítmico.

Existe una diferencia importante reportada en la literatura acerca de los efectos que tienen las sustancias cannabinoides sobre el corazón, algunos autores sostienen la idea que estas sustancias provocan un aumento en la frecuencia cardíaca (Cohen, Weizman, & Weinstein, 2019; Grotenhermen, 2003); lo anterior también se plasma en algunos ensayos clínicos donde se evaluaron los efectos de fármacos derivados el THC como nabilona y dronabinol, causantes de una taquicardia transitoria que muestra ser dependiente de la dosis que es administrada (Bedi, Cooper, & Haney, 2013); la causa de dicha taquicardia podría ser resultado de una compensación del sistema simpático a la disminución de la resistencia vascular periférica inducida por la estimulación de los receptores  $\text{CB}_1$  (Pacher, Steffens, Hasko, Schindler, & Kunos, 2018); sin que esta llegue a ser una razón absoluta. En contraste a lo descrito anteriormente, algunos otros autores mencionan que los cannabinoides provocan bradicardia (Randall, Harris, Kendall, & Ralevic, 2002). Los resultados en nuestro estudio muestran que los cannabinoides, incluyendo el THC, podrían provocar un enlentecimiento del ritmo cardíaco. Es preciso mencionar que el establecimiento de la frecuencia cardíaca es un proceso muy complejo, que depende de influencias extrínsecas al corazón como las provenientes del sistema nervioso central y periférico, dichas acciones están mediadas por la interacción de los cannabinoides con los receptores  $\text{CB}_1$ ; aunque este mismo receptor, también se expresa en las membranas plasmáticas de los cardiomiocitos y está relacionada con cambios en el cronotropismo e inotropismo (Hiley, 2009; Randall, Kendall, & O'Sullivan, 2004). También se tiene conocimiento que los cannabinoides pueden afectar el funcionamiento del corazón a través de otros mecanismos como el bloqueo de corrientes de sodio, un efecto

similar al obtenido por los fármacos antiarrítmicos de clase I (Mankad & Kalahasty, 2019; Shu, Zhou, Patel, & Yan, 2009). Estudios publicados por Al Kury y colaboradores muestran con técnicas de radioligando, que los cannabinoides tienen también una alta afinidad por canales iónicos dependientes de voltaje y modifican algunos aspectos biofísicos incluyendo la dependencia de voltaje para la inactivación de estado estable. (Al Kury, Voitychuk, Ali, et al., 2014; Al Kury, Voitychuk, Yang, et al., 2014). También se ha demostrado en células que no expresan receptores CB, que hay inhibición de las corrientes de sodio a través de canales dependientes de voltaje.

Otro parámetro que se ve modificado en presencia de THC es la constante de tiempo para la activación, según nuestro estudio, en presencia de THC se produce una aceleración en la activación del canal, estos resultados no han sido descritos con anterioridad, pero sugieren que el THC consigue mover más rápido, el dominio formador del poro y con ello alcanzar los picos de corriente de forma más rápida, desde los -40 y hasta los -20 mV. La inactivación del canal, con THC, también se ve modificada; nuestros datos muestran un aumento de la velocidad de inactivación del hNav1.5 en el rango de los -30 y hasta los +10 mV; en nuestra revisión de la literatura, no se obtuvo información que relacione específicamente al THC con la constante de inactivación, pero sí con sustancias endocannabinoides como la AEA. Al Kury apoya los datos presentados en esta investigación con experimentos en el rNav1.5 pues obtiene diferencias significativas en la inactivación desde los -50 y hasta los +20 mV, en este parámetro al aplicar AEA (Al Kury, Voitychuk, Yang, et al., 2014); también Marchese encontró una ligera pero significativa diferencia en este parámetro (Marchese-Rojas et al., 2022). Los cambios en la cinética de activación e inactivación sumado al bloqueo no dependiente de voltaje son resultado de la interacción del THC con regiones del dominio formador del poro del canal y no con el dominio sensor de voltaje. Debido a la naturaleza altamente lipofílica de las sustancias cannabinoides, pueden atravesar con mucha facilidad la membrana plasmática de la célula y dirigirse hacia las fenestraciones cercanas al DFP, este mecanismo de interacción ha sido planteado por diferentes autores, utilizando diversas técnicas de estudio. Se

piensa que dos de los sitios más importantes para la interacción con sustancias cannabinoides son el M175 y el F1763 que se encuentran muy cercanos al sitio de unión a anestésicos locales (Ghovanloo, Dib-Hajj, Goodchild, Ruben, & Waxman, 2022; Ghovanloo & Ruben, 2022; Sait et al., 2020; Watkins, 2019), aunque estudios electrofisiológicos con mutaciones en los sitios de unión para esas sustancias, sugieren que no es un sitio determinante (Foadi et al., 2014), por tanto, no existe aún evidencia contundente al respecto.

En cuanto al curso temporal de la recuperación de la inactivación, cuando el hNav1.5 interactúa con el THC, se produce un enlentecimiento en las constantes de tiempo rápida y lenta, siendo significativo únicamente para la ( $\tau_1$ ); algo similar es planteado por otros autores, cuyos experimentos con CBD en el hNav1.6 y el hNav1.4 muestran también un enlentecimiento en la recuperación de la inactivación (Ghovanloo et al., 2018; Huang, Lin, Chen, & Lee, 2021). La recuperación de la inactivación es un periodo de tiempo en que los canales iónicos pasan del estado inactivado (no conductor) a abierto (conductor), en el hNav1.5, responsable del potencial de acción cardíaco, la recuperación de la inactivación es un proceso más lento que en otras isoformas y como se ha mencionado antes, este fenómeno cumple el objetivo de disminuir el periodo refractario relativo y con ello evitar la formación de potenciales de acción prematuros. En esta investigación, hemos encontrado que el THC enlentece aún más la recuperación de la inactivación; con estos hallazgos se demuestra una vez más que el THC tiene un efecto negativo sobre el cronotropismo del corazón.

El THC no provocó cambios relacionados con el bloqueo dependiente de uso y frecuencia, dichos datos apoyarían la idea de que esta sustancia no tiene predilección por los canales cuando están en estado inactivo y que el THC tampoco comparte el sitio de unión con fármacos como los anestésicos locales. La lidocaína y otros fármacos anestésicos locales tienen un efecto antiarrítmico; una de sus características más distintivas y por la que se les confiere su efecto, es la propiedad de acumular bloqueo cuando se les realizan pruebas repetitivas de

despolarización, a esta característica se le denomina dependencia de uso y frecuencia (Becker & Reed, 2006; Fozzard, Sheets, & Hanck, 2011).

La gráfica del curso temporal de la instalación del fármaco nos muestra que al THC le toma aproximadamente 8.5 minutos el alcanzar su efecto (con el ajuste monoexponencial se obtiene una  $\tau_{on}$  de casi 3 min), este dato, coincide con lo reportado anteriormente con ACEA, pues se ha encontrado que los efectos se alcanzan casi a los 10 minutos con una  $\tau_{on}$  de 2.33 min (Marchese-Rojas et al., 2022). El tiempo de instauración de la sustancia, sumado al carácter liposoluble de la misma, nos lleva a pensar que el THC consigue sus efectos al atravesar la membrana plasmática de la célula, en lugar de sólo unirse al vestíbulo externo del canal, pues en este caso, sería razonable pensar que el efecto se observaría en un periodo de tiempo menor. De forma muy interesante y en discrepancia en lo sucedido con otros cannabinoides como la AEA y la ACEA, el lavado del THC se logra en aproximadamente 3.3 minutos ( $\tau_{off}$  de casi 17 segundos), sugiriendo que esta sustancia, no se une de forma muy fuerte al canal, en contraste, a la ACEA le toma aproximadamente 20 minutos revertir su efecto (Marchese-Rojas et al., 2022).

## CONCLUSIONES

- El THC provoca un bloqueo dependiente de concentración e independiente del voltaje, sobre la corriente de sodio del hNav1.5.
- Una concentración de 8.3  $\mu\text{M}$  de THC produce un bloqueo del 50% ( $\text{EC}_{50}$ ), el bloqueo máximo se alcanza con una concentración de 30  $\mu\text{M}$ . Según los datos obtenidos con la ecuación de Hill, una molécula de THC interactúa con un canal de sodio.
- El THC no desplaza el pico de corriente, tampoco modifica el umbral de activación ni el potencial de inversión.
- El THC provoca un desplazamiento del  $V_{1/2}$  de inactivación hacia potenciales de membrana más negativos, mantiene sin cambios la pendiente ( $k$ ) de la curva. No produce cambios en  $V_{1/2}$  de activación, tampoco en la pendiente ( $k$ ).
- El THC produce un cambio significativo en la cinética del canal al provocar un aceleramiento en la  $\tau$  de activación e inactivación del canal.
- La recuperación de la inactivación del hNav1.5 se ve enlentecida en presencia de THC.
- El THC no muestra bloqueo de uso y frecuencia como las sustancias consideradas anestésicos locales.
- El tiempo de instalación del fármaco y la alta liposolubilidad apoyan la hipótesis de que el THC actúa atravesando la membrana plasmática de las células.

## REFERENCIAS

- Al Kury, L. T., Voitychuk, O. I., Ali, R. M., Galadari, S., Yang, K. H., Howarth, F. C., . . . Oz, M. (2014). Effects of endogenous cannabinoid anandamide on excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Cell Calcium*, *55*(2), 104-118. doi:10.1016/j.ceca.2013.12.005
- Al Kury, L. T., Voitychuk, O. I., Yang, K. H., Thayyullathil, F. T., Doroshenko, P., Ramez, A. M., . . . Oz, M. (2014). Effects of the endogenous cannabinoid anandamide on voltage-dependent sodium and calcium channels in rat ventricular myocytes. *Br J Pharmacol*, *171*(14), 3485-3498. doi:10.1111/bph.12734
- Alves, P., Amaral, C., Teixeira, N., & Correia-da-Silva, G. (2020). Cannabis sativa: Much more beyond Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Pharmacol Res*, *157*, 104822. doi:10.1016/j.phrs.2020.104822
- Amoros, I., Barana, A., Caballero, R., Gomez, R., Osuna, L., Lillo, M. P., . . . Delpon, E. (2010). Endocannabinoids and cannabinoid analogues block human cardiac Kv4.3 channels in a receptor-independent manner. *J Mol Cell Cardiol*, *48*(1), 201-210. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.07.011
- Antoni, H., Bocker, D., & Eickhorn, R. (1988). Sodium current kinetics in intact rat papillary muscle: measurements with the loose-patch-clamp technique. *J Physiol*, *406*, 199-213. doi:10.1113/jphysiol.1988.sp017376
- Ávila, R., & Cruz, R. (2013). Modelos matemáticos de células excitables I. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, *1*(1). doi:10.29057/icbi.v1i1.496
- Bai, Y., Jiang, M., Xie, T., Jiang, C., Gu, M., Zhou, X., . . . Huang, L. (2021). Archaeobotanical evidence of the use of medicinal cannabis in a secular context unearthed from south China. *J Ethnopharmacol*, *275*, 114114. doi:10.1016/j.jep.2021.114114
- Bane, V., Lehane, M., Dikshit, M., O'Riordan, A., & Furey, A. (2014). Tetrodotoxin: chemistry, toxicity, source, distribution and detection. *Toxins (Basel)*, *6*(2), 693-755. doi:10.3390/toxins6020693
- Becker, D. E., & Reed, K. L. (2006). Essentials of Local Anesthetic Pharmacology. *Anesthesia Progress*, *53*(3), 98-109. doi:10.2344/0003-3006(2006)53[98:EOLAP]2.0.CO;2 %J Anesthesia Progress
- Bedi, G., Cooper, Z. D., & Haney, M. (2013). Subjective, cognitive and cardiovascular dose-effect profile of nabilone and dronabinol in marijuana smokers. *Addict Biol*, *18*(5), 872-881. doi:10.1111/j.1369-1600.2011.00427.x
- Bennett, D. L., Clark, A. J., Huang, J., Waxman, S. G., & Dib-Hajj, S. D. (2019). The Role of Voltage-Gated Sodium Channels in Pain Signaling. *Physiol Rev*, *99*(2), 1079-1151. doi:10.1152/physrev.00052.2017
- Bennett, E. S. (2001). Channel cytoplasmic loops alter voltage-dependent sodium channel activation in an isoform-specific manner. *J Physiol*, *535*(Pt 2), 371-381. doi:10.1111/j.1469-7793.2001.t01-1-00371.x

- Bers, D. M. (2008). Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol*, 70, 23-49. doi:10.1146/annurev.physiol.70.113006.100455
- Bevan, S., Quallo, T., & Andersson, D. A. (2014). Trpv1. *Handb Exp Pharmacol*, 222, 207-245. doi:10.1007/978-3-642-54215-2\_9
- Bhatt, M., Di Iacovo, A., Romanazzi, T., Roseti, C., Cinquetti, R., & Bossi, E. (2022). The "www" of *Xenopus laevis* Oocytes: The Why, When, What of *Xenopus laevis* Oocytes in Membrane Transporters Research. *Membranes (Basel)*, 12(10). doi:10.3390/membranes12100927
- Biringer, R. G. (2021). The rise and fall of anandamide: processes that control synthesis, degradation, and storage. *Mol Cell Biochem*, 476(7), 2753-2775. doi:10.1007/s11010-021-04121-5
- Bouza, A. A., & Isom, L. L. (2018). Voltage-Gated Sodium Channel beta Subunits and Their Related Diseases. *Handb Exp Pharmacol*, 246, 423-450. doi:10.1007/164\_2017\_48
- Burstein, S. (2015). Cannabidiol (CBD) and its analogs: a review of their effects on inflammation. *Bioorg Med Chem*, 23(7), 1377-1385. doi:10.1016/j.bmc.2015.01.059
- Carmeliet, E. (2019). From Bernstein's rheotome to Neher-Sakmann's patch electrode. The action potential. 7(1), e13861. doi:https://doi.org/10.14814/phy2.13861
- 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(4), 397-409. doi:10.1124/pr.57.4.4
- Catterall, W. A., Lenaeus, M. J., & Gamal El-Din, T. M. (2020). Structure and Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 60, 133-154. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010818-021757
- Choudhary, G., Yotsu-Yamashita, M., Shang, L., Yasumoto, T., & Dudley, S. C., Jr. (2003). Interactions of the C-11 hydroxyl of tetrodotoxin with the sodium channel outer vestibule. *Biophys J*, 84(1), 287-294. doi:10.1016/S0006-3495(03)74849-8
- Clarke, R. C., & Merlin, M. D. (2013). *Cannabis Evolution and Ethnobotany* (1 ed.): University of California Press.
- Cohen, K., Weizman, A., & Weinstein, A. (2019). Positive and Negative Effects of Cannabis and Cannabinoids on Health. *Clin Pharmacol Ther*, 105(5), 1139-1147. doi:10.1002/cpt.1381
- Cristino, L., Bisogno, T., & Di Marzo, V. (2020). Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nat Rev Neurol*, 16(1), 9-29. doi:10.1038/s41582-019-0284-z
- Cristino, L., Imperatore, R., & Di Marzo, V. (2017). Techniques for the Cellular and Subcellular Localization of Endocannabinoid Receptors and Enzymes in the Mammalian Brain. *Methods Enzymol*, 593, 61-98. doi:10.1016/bs.mie.2017.05.003
- Crocq, M. A. (2020). History of cannabis and the endocannabinoid system. *Dialogues Clin Neurosci*, 22(3), 223-228. doi:10.31887/DCNS.2020.22.3/mcrocq

- de Lera Ruiz, M., & Kraus, R. L. (2015). Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. *J Med Chem*, *58*(18), 7093-7118. doi:10.1021/jm501981g
- Detta, N., Frisso, G., & Salvatore, F. (2015). The multi-faceted aspects of the complex cardiac Nav1.5 protein in membrane function and pathophysiology. *Biochim Biophys Acta*, *1854*(10 Pt A), 1502-1509. doi:10.1016/j.bbapap.2015.07.009
- Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., . . . Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, *258*(5090), 1946-1949. doi:10.1126/science.1470919
- Dibb, K. M., Eisner, D. A., & Trafford, A. W. (2007). Regulation of systolic  $[Ca^{2+}]_i$  and cellular  $Ca^{2+}$  flux balance in rat ventricular myocytes by SR  $Ca^{2+}$ , L-type  $Ca^{2+}$  current and diastolic  $[Ca^{2+}]_i$ . *J Physiol*, *585*(Pt 2), 579-592. doi:10.1113/jphysiol.2007.141473
- Dudel, J., & Rudel, R. (1970). Voltage and time dependence of excitatory sodium current in cooled sheep Purkinje fibres. *Pflugers Arch*, *315*(2), 136-158. doi:10.1007/BF00586657
- Dudev, T., & Lim, C. (2014). Ion selectivity strategies of sodium channel selectivity filters. *Acc Chem Res*, *47*(12), 3580-3587. doi:10.1021/ar5002878
- Duranti, A., Beldarrain, G., Alvarez, A., Sbriscia, M., Carloni, S., Balduini, W., & Alonso-Alconada, D. (2022). The Endocannabinoid System as a Target for Neuroprotection/Neuroregeneration in Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Biomedicines*, *11*(1). doi:10.3390/biomedicines11010028
- Fay, J. F., Dunham, T. D., & Farrens, D. L. (2005). Cysteine residues in the human cannabinoid receptor: only C257 and C264 are required for a functional receptor, and steric bulk at C386 impairs antagonist SR141716A binding. *Biochemistry*, *44*(24), 8757-8769. doi:10.1021/bi0472651
- Fedida, D., Wible, B., Wang, Z., Fermini, B., Faust, F., Nattel, S., & Brown, A. M. (1993). Identity of a novel delayed rectifier current from human heart with a cloned  $K^+$  channel current. *Circ Res*, *73*(1), 210-216. doi:10.1161/01.res.73.1.210
- Foadi, N., Berger, C., Pilawski, I., Stoetzer, C., Karst, M., Haeseler, G., . . . Ahrens, J. (2014). Inhibition of voltage-gated  $Na^+$  channels by the synthetic cannabinoid ajulemic acid. *Anesth Analg*, *118*(6), 1238-1245. doi:10.1213/ANE.0000000000000188
- Fozzard, H. A., Friedlander, I. R., Hanck, D. A., January, C. T., Makielski, J. C., & Sheets, M. F. (1986). Sodium currents in single cardiac Purkinje cells. *J Am Coll Cardiol*, *8*(1 Suppl A), 79A-85A. doi:10.1016/s0735-1097(86)80033-x
- Fozzard, H. A., Sheets, M. F., & Hanck, D. A. (2011). The sodium channel as a target for local anesthetic drugs. *Front Pharmacol*, *2*, 68. doi:10.3389/fphar.2011.00068
- Gaborit, N., Le Bouter, S., Szuts, V., Varro, A., Escande, D., Nattel, S., & Demolombe, S. (2007). Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J Physiol*, *582*(Pt 2), 675-693. doi:10.1113/jphysiol.2006.126714

- Ghovanloo, M. R., Aimar, K., Ghadir-Tavi, R., Yu, A., & Ruben, P. C. (2016). Physiology and Pathophysiology of Sodium Channel Inactivation. *Curr Top Membr*, 78, 479-509. doi:10.1016/bs.ctm.2016.04.001
- Ghovanloo, M. R., Dib-Hajj, S. D., Goodchild, S. J., Ruben, P. C., & Waxman, S. G. (2022). Non-psychotropic phytocannabinoid interactions with voltage-gated sodium channels: An update on cannabidiol and cannabigerol. *Front Physiol*, 13, 1066455. doi:10.3389/fphys.2022.1066455
- Ghovanloo, M. R., & Ruben, P. C. (2022). Cannabidiol and Sodium Channel Pharmacology: General Overview, Mechanism, and Clinical Implications. *Neuroscientist*, 28(4), 318-334. doi:10.1177/10738584211017009
- Ghovanloo, M. R., Shuart, N. G., Mezeyova, J., Dean, R. A., Ruben, P. C., & Goodchild, S. J. (2018). Inhibitory effects of cannabidiol on voltage-dependent sodium currents. *J Biol Chem*, 293(43), 16546-16558. doi:10.1074/jbc.RA118.004929
- Goldfarb, M. (2012). Voltage-gated sodium channel-associated proteins and alternative mechanisms of inactivation and block. *Cell Mol Life Sci*, 69(7), 1067-1076. doi:10.1007/s00018-011-0832-1
- Goldin, A. L. (2001). Resurgence of sodium channel research. *Annu Rev Physiol*, 63, 871-894. doi:10.1146/annurev.physiol.63.1.871
- Goldin, A. L. (2003). Mechanisms of sodium channel inactivation. *Curr Opin Neurobiol*, 13(3), 284-290. doi:10.1016/s0959-4388(03)00065-5
- Grotenhermen, F. (2003). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clin Pharmacokinet*, 42(4), 327-360. doi:10.2165/00003088-200342040-00003
- Guan, B., Chen, X., & Zhang, H. (2013). Two-Electrode Voltage Clamp. In N. Gamper (Ed.), *Ion Channels: Methods and Protocols* (pp. 79-89). Totowa, NJ: Humana Press.
- Hanck, D. A., & Fozzard, H. A. (2007). Voltage-Gated Sodium Channels. In S.-H. Chung, O. S. Andersen, & V. Krishnamurthy (Eds.), *Biological Membrane Ion Channels: Dynamics, Structure, and Applications* (pp. 219-239). New York, NY: Springer New York.
- Hebert-Chatelain, E., Desprez, T., Serrat, R., Bellocchio, L., Soria-Gomez, E., Busquets-Garcia, A., . . . Marsicano, G. (2016). A cannabinoid link between mitochondria and memory. *Nature*, 539(7630), 555-559. doi:10.1038/nature20127
- Hiley, C. R. (2009). Endocannabinoids and the heart. *J Cardiovasc Pharmacol*, 53(4), 267-276. doi:10.1097/FJC.0b013e318192671d
- Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A., . . . Pertwee, R. G. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*, 54(2), 161-202. doi:10.1124/pr.54.2.161
- Huang, C. W., Lin, P. C., Chen, J. L., & Lee, M. J. (2021). Cannabidiol Selectively Binds to the Voltage-Gated Sodium Channel Na(v)1.4 in Its Slow-Inactivated State and Inhibits Sodium Current. *Biomedicines*, 9(9). doi:10.3390/biomedicines9091141

- Iannotti, F. A., & Vitale, R. M. (2021). The Endocannabinoid System and PPARs: Focus on Their Signalling Crosstalk, Action and Transcriptional Regulation. *Cells*, *10*(3). doi:10.3390/cells10030586
- Jiang, D., Shi, H., Tonggu, L., Gamal El-Din, T. M., Lenaeus, M. J., Zhao, Y., . . . Catterall, W. A. (2020). Structure of the Cardiac Sodium Channel. *Cell*, *180*(1), 122-134 e110. doi:10.1016/j.cell.2019.11.041
- Joshi, N., & Onaivi, E. S. (2019). Endocannabinoid System Components: Overview and Tissue Distribution. *Adv Exp Med Biol*, *1162*, 1-12. doi:10.1007/978-3-030-21737-2\_1
- Jost, N., Papp, J. G., & Varro, A. (2007). Slow delayed rectifier potassium current (IKs) and the repolarization reserve. *Ann Noninvasive Electrocardiol*, *12*(1), 64-78. doi:10.1111/j.1542-474X.2007.00140.x
- Jost, N., Virag, L., Bitay, M., Takacs, J., Lengyel, C., Biliczki, P., . . . Varro, A. (2005). Restricting excessive cardiac action potential and QT prolongation: a vital role for IKs in human ventricular muscle. *Circulation*, *112*(10), 1392-1399. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.550111
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S., Hudspeth, A. J., & Mack, S. (2000). *Principles of neural science* (Vol. 4): McGraw-hill New York.
- Katona, I., & Freund, T. F. (2008). Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat Med*, *14*(9), 923-930. doi:10.1038/nm.f.1869
- Lee, C. H., & Ruben, P. C. (2008). Interaction between voltage-gated sodium channels and the neurotoxin, tetrodotoxin. *Channels (Austin)*, *2*(6), 407-412. doi:10.4161/chan.2.6.7429
- Lengyel, C., Virag, L., Biro, T., Jost, N., Magyar, J., Biliczki, P., . . . Varro, A. (2007). Diabetes mellitus attenuates the repolarization reserve in mammalian heart. *Cardiovasc Res*, *73*(3), 512-520. doi:10.1016/j.cardiores.2006.11.010
- Li, Z., Jin, X., Wu, T., Huang, G., Wu, K., Lei, J., . . . Yan, N. (2021). Structural Basis for Pore Blockade of the Human Cardiac Sodium Channel Nav 1.5 by the Antiarrhythmic Drug Quinidine\*. *Angew Chem Int Ed Engl*, *60*(20), 11474-11480. doi:10.1002/anie.202102196
- Lin, M., Aladejebi, O., & Hockerman, G. H. (2011). Distinct properties of amlodipine and nifedipine block of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels Cav1.2 and Cav2.1 and the mutant channels Cav1.2/dihydropyridine insensitive and Cav2.1/dihydropyridine sensitive. *Eur J Pharmacol*, *670*(1), 105-113. doi:10.1016/j.ejphar.2011.08.005
- Lowin, T., & Straub, R. H. (2015). Cannabinoid-based drugs targeting CB1 and TRPV1, the sympathetic nervous system, and arthritis. *Arthritis Res Ther*, *17*(1), 226. doi:10.1186/s13075-015-0743-x
- Mangoni, M. E., Couette, B., Marger, L., Bourinet, E., Striessnig, J., & Nargeot, J. (2006). Voltage-dependent calcium channels and cardiac pacemaker activity: from ionic currents to genes. *Prog Biophys Mol Biol*, *90*(1-3), 38-63. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2005.05.003
- Mankad, P., & Kalahasty, G. (2019). Antiarrhythmic Drugs: Risks and Benefits. *Med Clin North Am*, *103*(5), 821-834. doi:10.1016/j.mcna.2019.05.004

- Marchese-Rojas, M., Islas, A. A., Mancilla-Simbro, C., Millan-PerezPena, L., Leon, J. S., & Salinas-Stefanon, E. M. (2022). Inhibition of the Human Neuronal Sodium Channel Na(v)1.9 by Arachidonyl-2-Chloroethylamide, An Analogue of Anandamide in a hNa(v)1.9/rNa(v)1.4 Chimera, An Experimental and in Silico Study. *Neuroscience*. doi:10.1016/j.neuroscience.2022.09.015
- Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., & Bonner, T. I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, *346*(6284), 561-564. doi:10.1038/346561a0
- Mechoulam, R., & Gaoni, Y. (1965). A Total Synthesis of DI-Delta-1-Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc*, *87*, 3273-3275. doi:10.1021/ja01092a065
- Mechoulam, R., & Parker, L. A. (2013). The endocannabinoid system and the brain. *Annu Rev Psychol*, *64*, 21-47. doi:10.1146/annurev-psych-113011-143739
- Moczydlowski, E. G. (2013). The molecular mystique of tetrodotoxin. *Toxicon*, *63*, 165-183. doi:10.1016/j.toxicon.2012.11.026
- Moczydlowski, E. G. (2016). On the Natural and Unnatural History of the Voltage-Gated Na(+) Channel. *Curr Top Membr*, *78*, 3-36. doi:10.1016/bs.ctm.2016.06.002
- Moreau, A., Gosselin-Badaroudine, P., Mercier, A., Burger, B., Keller, D. I., & Chahine, M. (2018). A leaky voltage sensor domain of cardiac sodium channels causes arrhythmias associated with dilated cardiomyopathy. *Sci Rep*, *8*(1), 13804. doi:10.1038/s41598-018-31772-0
- Munro, S., Thomas, K. L., & Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, *365*(6441), 61-65. doi:10.1038/365061a0
- Nerbonne, J. M., & Kass, R. S. (2005). Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev*, *85*(4), 1205-1253. doi:10.1152/physrev.00002.2005
- Noreng, S., Li, T., & Payandeh, J. (2021). Structural Pharmacology of Voltage-Gated Sodium Channels. *J Mol Biol*, *433*(17), 166967. doi:10.1016/j.jmb.2021.166967
- O'Malley, H. A., & Isom, L. L. (2015). Sodium channel beta subunits: emerging targets in channelopathies. *Annu Rev Physiol*, *77*, 481-504. doi:10.1146/annurev-physiol-021014-071846
- Odening, K. E., & Koren, G. (2014). How do sex hormones modify arrhythmogenesis in long QT syndrome? Sex hormone effects on arrhythmogenic substrate and triggered activity. *Heart Rhythm*, *11*(11), 2107-2115. doi:10.1016/j.hrthm.2014.06.023
- Okura, D., Horishita, T., Ueno, S., Yanagihara, N., Sudo, Y., Uezono, Y., & Sata, T. (2014). The endocannabinoid anandamide inhibits voltage-gated sodium channels Nav1.2, Nav1.6, Nav1.7, and Nav1.8 in *Xenopus* oocytes. *Anesth Analg*, *118*(3), 554-562. doi:10.1213/ANE.0000000000000070
- Pacher, P., & Mechoulam, R. (2011). Is lipid signaling through cannabinoid 2 receptors part of a protective system? *Prog Lipid Res*, *50*(2), 193-211. doi:10.1016/j.plipres.2011.01.001

- Pacher, P., Steffens, S., Hasko, G., Schindler, T. H., & Kunos, G. (2018). Cardiovascular effects of marijuana and synthetic cannabinoids: the good, the bad, and the ugly. *Nat Rev Cardiol*, *15*(3), 151-166. doi:10.1038/nrcardio.2017.130
- Payandeh, J., Gamal El-Din, T. M., Scheuer, T., Zheng, N., & Catterall, W. A. (2012). Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states. *Nature*, *486*(7401), 135-139. doi:10.1038/nature11077
- Pless, S. A., Elstone, F. D., Niciforovic, A. P., Galpin, J. D., Yang, R., Kurata, H. T., & Ahern, C. A. (2014). Asymmetric functional contributions of acidic and aromatic side chains in sodium channel voltage-sensor domains. *J Gen Physiol*, *143*(5), 645-656. doi:10.1085/jgp.201311036
- Puhl, S. L. (2020). Cannabinoid-sensitive receptors in cardiac physiology and ischaemia. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, *1867*(3), 118462. doi:10.1016/j.bbamcr.2019.03.009
- Randall, M. D., Harris, D., Kendall, D. A., & Ralevic, V. (2002). Cardiovascular effects of cannabinoids. *Pharmacol Ther*, *95*(2), 191-202. doi:10.1016/s0163-7258(02)00258-9
- Randall, M. D., Kendall, D. A., & O'Sullivan, S. (2004). The complexities of the cardiovascular actions of cannabinoids. *Br J Pharmacol*, *142*(1), 20-26. doi:10.1038/sj.bjp.0705725
- Rasar, M. A., & Hammes, S. R. (2006). The Physiology of the *Xenopus laevis* Ovary. In X. J. Liu (Ed.), *Xenopus Protocols: Cell Biology and Signal Transduction* (pp. 17-30). Totowa, NJ: Humana Press.
- Russo, E. B., Jiang, H. E., Li, X., Sutton, A., Carboni, A., del Bianco, F., . . . Li, C. S. (2008). Phytochemical and genetic analyses of ancient cannabis from Central Asia. *J Exp Bot*, *59*(15), 4171-4182. doi:10.1093/jxb/ern260
- Sait, L. G., Sula, A., Ghovanloo, M. R., Hollingworth, D., Ruben, P. C., & Wallace, B. A. (2020). Cannabidiol interactions with voltage-gated sodium channels. *Elife*, *9*. doi:10.7554/eLife.58593
- Schneider, T., Dibue-Adjei, M., Neumaier, F., Akhtar, I., Hescheler, J., Kamp, M. A., & Tevoufouet, E. E. (2015). R-Type Voltage-Gated Ca(2)(+) Channels in Cardiac and Neuronal Rhythmogenesis. *Curr Mol Pharmacol*, *8*(1), 102-108. doi:10.2174/1874467208666150507093845
- Shen, H., Liu, D., Wu, K., Lei, J., & Yan, N. (2019). Structures of human Nav1.7 channel in complex with auxiliary subunits and animal toxins. *Science*, *363*(6433), 1303-1308. doi:10.1126/science.aaw2493
- Shu, J., Zhou, J., Patel, C., & Yan, G. X. (2009). Pharmacotherapy of cardiac arrhythmias--basic science for clinicians. *Pacing Clin Electrophysiol*, *32*(11), 1454-1465. doi:10.1111/j.1540-8159.2009.02526.x
- Smita, K., Sushil Kumar, V., & Premendran, J. S. (2007). Anandamide: an update. *Fundam Clin Pharmacol*, *21*(1), 1-8. doi:10.1111/j.1472-8206.2006.00454.x
- Smith, P. L., Baukrowitz, T., & Yellen, G. (1996). The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature*, *379*(6568), 833-836. doi:10.1038/379833a0
- Stumpf, A., Parthier, D., Sammons, R. P., Stempel, A. V., Breustedt, J., Rost, B. R., & Schmitz, D. (2018). Cannabinoid type 2 receptors mediate a cell type-

- specific self-inhibition in cortical neurons. *Neuropharmacology*, 139, 217-225. doi:10.1016/j.neuropharm.2018.07.020
- Sunami, A., Glaaser, I. W., & Fozzard, H. A. (2000). A critical residue for isoform difference in tetrodotoxin affinity is a molecular determinant of the external access path for local anesthetics in the cardiac sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(5), 2326-2331. doi:10.1073/pnas.030438797
- Varro, A., Tomek, J., Nagy, N., Virag, L., Passini, E., Rodriguez, B., & Baczko, I. (2021). Cardiac transmembrane ion channels and action potentials: cellular physiology and arrhythmogenic behavior. *Physiol Rev*, 101(3), 1083-1176. doi:10.1152/physrev.00024.2019
- Verdurand, M., Nguyen, V., Stark, D., Zahra, D., Gregoire, M. C., Greguric, I., & Zavitsanou, K. (2011). Comparison of Cannabinoid CB(1) Receptor Binding in Adolescent and Adult Rats: A Positron Emission Tomography Study Using [F]MK-9470. *Int J Mol Imaging*, 2011, 548123. doi:10.1155/2011/548123
- Virag, L., Jost, N., Opincariu, M., Szolnoky, J., Szecsi, J., Bogats, G., . . . Papp, J. G. (2001). The slow component of the delayed rectifier potassium current in undiseased human ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*, 49(4), 790-797. doi:10.1016/s0008-6363(00)00306-0
- Virag, L., Jost, N., Papp, R., Koncz, I., Kristof, A., Kohajda, Z., . . . Varro, A. (2011). Analysis of the contribution of I(to) to repolarization in canine ventricular myocardium. *Br J Pharmacol*, 164(1), 93-105. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01331.x
- Wagner, C. A., Friedrich, B., Setiawan, I., Lang, F., & Broer, S. (2000). The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cell Physiol Biochem*, 10(1-2), 1-12. doi:10.1159/000016341
- Watkins, A. R. (2019). Cannabinoid interactions with ion channels and receptors. *Channels (Austin)*, 13(1), 162-167. doi:10.1080/19336950.2019.1615824
- Xiao, Y. F., Ke, Q., Wang, S. Y., Auktor, K., Yang, Y., Wang, G. K., . . . Leaf, A. (2001). Single point mutations affect fatty acid block of human myocardial sodium channel alpha subunit Na<sup>+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(6), 3606-3611. doi:10.1073/pnas.061003798
- Xu, L., Ding, X., Wang, T., Mou, S., Sun, H., & Hou, T. (2019). Voltage-gated sodium channels: structures, functions, and molecular modeling. *Drug Discov Today*, 24(7), 1389-1397. doi:10.1016/j.drudis.2019.05.014
- Yue, L., Feng, J., Li, G. R., & Nattel, S. (1996). Characterization of an ultrarapid delayed rectifier potassium channel involved in canine atrial repolarization. *J Physiol*, 496 ( Pt 3), 647-662. doi:10.1113/jphysiol.1996.sp021716
- Zimmer, T., Haufe, V., & Blechschmidt, S. (2014). Voltage-gated sodium channels in the mammalian heart. *Glob Cardiol Sci Pract*, 2014(4), 449-463. doi:10.5339/gcsp.2014.58

## ANEXOS

### Anexo 1. Comprobación de la identidad e integridad del ADNc que codifica para el hNav1.5.

En la figura 9 se muestra un gel de agarosa al 0.8%, en él se puede visualizar el mapa de restricción del ADNc que codifica para el hNav1.5, gracias a los cortes realizados con la enzima BamHI es posible identificar cuatro fragmentos de ADN cuyos pesos moleculares en pares de bases (pb) son: 6000, 2000, 1800 y 1500.

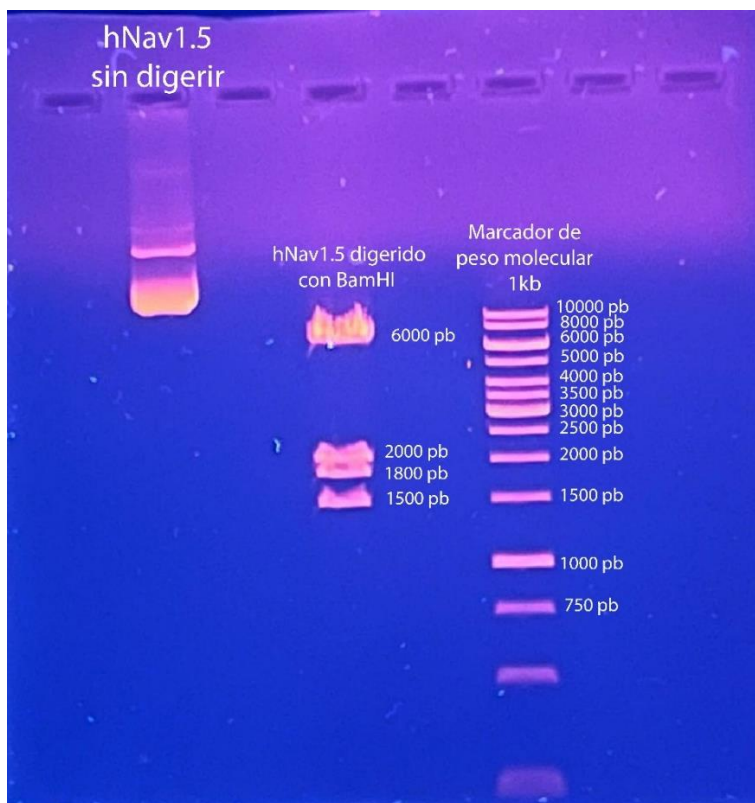


Figura 9: Mapa de restricción del hNav1.5 cortado con la enzima BamHI y con sus respectivos pesos moleculares en pares de bases. Carril 1: hNav1.5 sin digerir, Carril 2: hNav1.5 digerido; Carril 3: marcador de peso molecular.