

FACULTAD DE CIENCIAS
GRADO EN BIOLOGÍA
TRABAJO FIN DE GRADO
CURSO ACADÉMICO [2018-2019]

TÍTULO:

**MODULACIÓN DE CANALES IÓNICOS DE RELEVANCIA
TERAPÉUTICA POR LA PEIMINA, UN ANÁLOGO ESTRUCTURAL
DE ANESTÉSICOS LOCALES**

AUTOR:

PAULA MATEO MONFORTE

RESUMEN

La peimina es un glucoalcaloide protonado a pH fisiológico ($pK_a = 9,5$) utilizado comúnmente en la medicina tradicional china para aliviar síntomas gripales. El desconocimiento de los mecanismos por los que ejerce estas funciones la convierte en objeto de estudio de este trabajo, en el cual se ahonda en las posibles interacciones de la peimina, en el rango micromolar, con distintos canales iónicos de relevancia terapéutica como el receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR), el canal de Cl^- activado por Ca^{+2} (CaCC) y el canal de cloruro activado por voltaje CIC-0. Mediante la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos en ovocitos de *Xenopus*, se pudo obtener que, a una concentración de $5 \mu M$, la peimina: i) inhibe la corriente evocada por ACh (I_{ACh}), probablemente favoreciendo el estado desensibilizado del nAChR, dado que acelera la fase de desensibilización de la I_{ACh} y que el porcentaje de la I_{ACh} es mayor en la fase de meseta que en el pico de la corriente; ii) potencia la corriente evocada por CaCC (I_{CaCC}), incluso a concentraciones submicromolares en algunas células y iii) inhibe la corriente evocada por CIC-0 (I_{CIC-0}) de una manera voltaje-dependiente, aumentando la inhibición con la hiperpolarización de la membrana. Es importante destacar que la peimina produce todos estos efectos a concentraciones inferiores a las requeridas por otros moduladores de estos canales iónicos.

Palabras clave: peimina; nAChR; CaCC; CIC-0; modulación de canales iónicos.

ABSTRACT

Peimine is a glycoalkaloid protonated at physiological pH ($pK_a = 9.5$) commonly used in traditional Chinese medicine to relieve flu-like symptoms. The lack of knowledge of the mechanisms by which it exercises these functions makes this research to focus on it, delving into the possible interactions of the peimine, in the micromolar range, with different ion channels of therapeutic relevance such as nicotinic acetylcholine receptor (nAChR), calcium-activated chloride channels (CaCC) and voltage activated chloride channel CIC-0. By means of two-electrode voltage clamp in *Xenopus* oocytes it was obtained that, at a concentration of 5 μ M, peimine: i) inhibits the current evoked by Ach (I_{ACh}), probably promoting the desensitized state of nAChR, since it accelerates the desensitization phase of I_{ACh} and the percentage of inhibition of I_{ACh} is greater at its steady state than at the peak of the current; ii) increases the current evoked by CaCC (I_{CaCC}), even at submicromolar concentrations in some cells and iii) inhibits the current evoked by CIC-0 (I_{CIC-0}) in a voltage-dependent manner increasing with hyperpolarization of the membrane. It is important to highlight that peimine produces all these effects at concentrations lower than those required by the modulators of these ion channels.

Keywords: peimine; nAChR; CaCC; CIC-0; ion channels modulation.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

9AC	Ácido 9-antraceno Carboxílico
ACh	Acetilcolina
CaCC	<i>Calcium-activated Chloride Channels</i> Canal de Cl ⁻ Activado por Ca ⁺²
cAMP	Adenosín Monofosfato Cíclico
CE ₅₀	Concentración necesaria para reducir a la mitad la corriente iónica
cGMP	Guanosín Monofosfato Cíclico
CIC	Canal Cloruro
CPP	Ácido 2-(<i>p</i> -clorofenoxi) Propiónico
DIDS	Ácido 4,4'-diisotiociano-2,2'-estilbendisulfónico
<i>I_{ACh}</i>	Corriente evocada por ACh
<i>I_{CaCC}</i>	Corriente evocada por CaCC
<i>I_{CIC-0}</i>	Corriente evocada por CIC-0
<i>I_{pico}</i>	Amplitud de la corriente en el pico
MONNA	Ácido N-[(4-metoxi)-2-naftil]-5-nitroantranílico
nAChR	<i>Nicotinic Acetylcholine Receptor</i> Receptor Nicotínico de Acetilcolina
QX-222	2-(trimetilamonio)-N-(2,6-dimietilfenil) acetamida cloruro
QX-314	2-(trietilamonio)-N-(2,6-demietilfenil) acetamida bromuro
RN	Solución Ringer Normal
RNA	Solución Ringer Normal con Atropina
SEM	<i>Standard Error Mean</i> Error Estándar de la Media
SOCs	<i>Store-Operated Channels</i> Canales Operados por Depósitos
V _c	Potencial Comando
VDCCs	<i>Voltage-dependent Calcium Channels</i> Canales de Ca ⁺² Voltaje Dependientes
V _m	Potencial de Membrana

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 CANALES IÓNICOS: FUNCIÓN FISIOLÓGICA E INTERÉS TERAPÉUTICO.....	1
1.1.1 RECEPTOR NICOTÍNICO DE ACETILCOLINA.....	2
1.1.2 CANAL DE CLORURO ACTIVADO POR CALCIO.....	4
1.1.3 CANAL DE CLORURO CIC.....	5
1.2 PEIMINA: POTENCIAL TERÁPICO EN LA MEDICINA TRADICIONAL CHINA.....	7
2. OBJETIVOS.....	10
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
3.1 PURIFICACIÓN Y RECONSTRUCCIÓN DE nAChRs.....	11
3.2 EXTRACCIÓN DE OVOCITOS DE <i>Xenopus laevis</i>	11
3.3 MICROINYECCIÓN DE OVOCITOS.....	12
3.4 MÉTODOS PARA EL REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO EN OVOCITOS.....	13
3.5 FIJACIÓN DE VOLTAJE.....	15
3.6 PROTOCOLO PARA EVALUAR EL EFECTO DE LA PEIMINA.....	16
3.6.1 En nAChRs de <i>Torpedo marmorata</i>	16
3.6.2 En CIC-0 de <i>Torpedo marmorata</i>	18
3.6.3 En CaCCs de <i>Xenopus laevis</i>	18
3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	19
3.8 PLAN DE TRABAJO.....	19
4. RESULTADOS.....	21
4.1 EFECTO DE LA PEIMINA EN nAChR.....	21
4.1.1 La peimina inhibe la I_{ACh}	21
4.1.2 La peimina reduce el tiempo al pico de la I_{ACh}	22
4.1.3 La peimina acelera la cinética de desensibilización de la I_{ACh}	22
4.2 EFECTO DE LA PEIMINA EN CaCC.....	23
4.2.1 La peimina potencia la I_{CaCC}	23
4.3 EFECTO DE LA PEIMINA EN CIC-0.....	26
4.3.1 La peimina inhibe la I_{CIC-0}	26
5. DISCUSIÓN.....	29
5.1 ACTUACIÓN SOBRE nAChR.....	29
5.2 ACTUACIÓN SOBRE CaCC.....	30
5.3 ACTUACIÓN SOBRE CIC-0.....	31

6. CONCLUSIONES.....	33
7. AGRADECIMIENTOS.....	34
8. BIBLIOGRAFÍA.....	35

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 CANALES IÓNICOS: FUNCIÓN FISIOLÓGICA E INTERÉS TERAPÉUTICO

Los canales iónicos son un tipo de proteínas localizadas en las membranas celulares, con una estructura semejante a un poro por el cual se permite el flujo de iones desde un lado de la membrana al otro. Los cambios en la concentración local de iones y por ende en el campo eléctrico celular juegan un papel central en los procesos fisiológicos, tan variados como la comunicación, proliferación y secreción celular (Kew and Davies, 2010).

La primera advertencia de la existencia de canales iónicos tuvo lugar en la década de 1950, cuando Alan Hodgkin y Andrew Huxley en sus estudios de la membrana del axón gigante de calamar encontraron una relación causal entre el aumento de permeabilidad de la membrana a Na^+ y la aparición del potencial de acción, vía fundamental de transmisión de códigos neuronales (Hodkin and Huxley, 1952). Este trabajo pionero inspiró a toda una generación de biofísicos a descubrir los principios por los que los canales iónicos se abrían o cerraban, los determinantes de su selectividad y de su modulación.

Los canales iónicos se ven envueltos en muchos, si no todos, las funciones celulares y por ello en diversas patologías ya sea indirecta o directamente, como ocurre en las canalopatías (mutación en el gen que codifica el canal). No resulta sorprendente, por tanto, que los canales iónicos constituyan una importante diana terapéutica (Camerino, Tricarico, and Desaphy, 2007). La función de estos canales es modulada por múltiples agentes naturales de los reinos planta y animal, siendo esta interacción la responsable, entre otras cosas, del efecto mortal de algunos venenos o del efecto beneficioso de ciertas hierbas medicinales. Una vez aislados, estos compuestos han servido como base para la síntesis de otros ligandos más específicos, con menos efectos secundarios. Es el caso de la cocaína, compuesto extraído de las hojas de la coca e introducido en la práctica médica por sus propiedades analgésicas. Sus efectos tóxicos, sin embargo, a nivel de sistema nervioso central y tejido cardiovascular impulsó a la ciencia a sintetizar nuevas variedades que podemos encontrar ampliamente utilizadas hoy en día como anestésicos locales (ej. lidocaína) al bloquear los canales de Na^+ (Ruetsch, Boni and Borgeat, 2001).

Los canales iónicos pueden clasificarse atendiendo a diversos criterios, incluyendo los genético-estructurales y los funcionales basados en sus mecanismos de activación. Atendiendo a criterios funcionales, los canales iónicos pueden clasificarse en 4 grupos principales: *i*) los activados por ligandos externos, como los receptores implicados en la transmisión sináptica rápida, incluyendo receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR);

ii) los activados por ligandos intracelulares, en general segundos mensajeros, como nucleótidos cíclicos (cAMP o cGMP) o el Ca^{+2} , entre los que se incluye el canal de cloruro activado por Ca^{+2} intracelular; *iii)* los activados por un campo eléctrico establecido a través de la membrana, como los canales voltaje-dependientes de Na^+ , K^+ , Ca^{+2} o Cl^- , entre los que se incluyen el canal de Cl^- presente en fibras musculares (CIC-1) o en la electroplaca de *Torpedo* (CIC-0); *iv)* los que son activados por tensión mecánica sobre el propio canal, o a través del citoesqueleto, como la familia de canales Piezo (Kew and Davies, 2010; Coste *et al.*, 2010).

Para el presente estudio sobre los efectos de la peimina en canales iónicos, hemos elegido 3 canales, como representantes de los 3 primeros tipos mencionados: el nAChR, el Cl^- activado por Ca^{+2} intracelular y el CIC-0. Estos canales han sido elegidos atendiendo a su relevancia fisiológica y a su interés para encontrar nuevos moduladores de su actividad, con previsible potencial terapéutico.

1.1.2 RECEPTOR NICOTÍNICO DE ACETILCOLINA

El nAChR es el miembro más conocido de la superfamilia de canales iónicos activados por ligando, siendo el primer receptor de un neurotransmisor en ser aislado y secuenciado (Flores Soto y Segura-Torres, 2015). Además, su función ha sido ampliamente estudiada, fundamentalmente a nivel de la unión neuromuscular, lo que le ha convertido en el principal modelo para el estudio de la estructura, función y farmacología de los receptores para otros neurotransmisores. Por otro lado, el nAChR desempeña importantes funciones tanto en el sistema nervioso central como periférico, de modo que su disfunción se relaciona con múltiples patologías, incluyendo diversas miastenias, algunos tipos de epilepsia, determinadas conductas adictivas y enfermedades neurodegenerativas tales como el Parkinson o el Alzheimer (Hurst, Rollemans and Bertrand, 2013; Taly *et al.*, 2009).

Según si la sinapsis química en la que participa permite la interacción entre dos neuronas o una neurona y una fibra muscular (unión neuromuscular) se diferencian nAChRs neuronales o musculares, respectivamente. En ambos casos se trata de canales ionotrópicos constituidos por 5 subunidades transmembrana ordenadas simétricamente alrededor de un eje perpendicular a la membrana, formando un poro permeable a los cationes Na^+ , K^+ y Ca^{+2} . Los receptores de la fibra muscular de vertebrados son heteroméricos, estando constituidos por las siguientes subunidades (Figura 1): 2 α_1 , 1 β_1 , 1 δ y 1 γ o ϵ , dependiendo del estadio de desarrollo (γ en fibras fetales y ϵ en adultas) (Patiño, 2008).

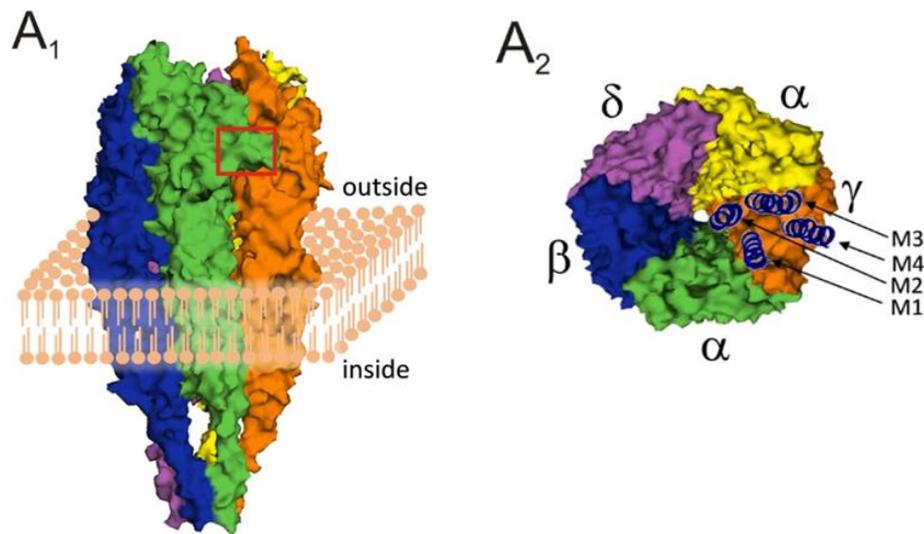


Figura 1. Vista lateral (A₁) y superior (A₂; desde la hendidura sináptica) del nAChR, mostrando su estructura pentamérica. El cuadrado rojo en A₁ indica el lugar de unión de la ACh (sitio ortostérico) entre las subunidades α-γ. No es el único, pues existe otro entre las subunidades α-δ. Cada subunidad contiene 4 segmentos transmembrana (M1-M4, mostrados como hélices en la subunidad γ y de la figura A2) (Arberola-Die *et al.*, 2019a).

En la unión neuromuscular, el proceso de activación se inicia con la llegada de un impulso nervioso que despolariza la membrana del terminal nervioso. Esto abre en el terminal canales de Ca⁺² dependientes de voltaje, que permiten el influjo de Ca⁺² al mismo lo cual promueve la liberación de acetilcolina (ACh) en la hendidura sináptica. La ACh liberada se une a los nAChRs de las células musculares, que sufren un cambio conformacional para permitir el flujo de iones a su través. Esta despolarización culmina, finalmente, en la contracción de la fibra muscular (Taleisnik, 2006).

Desde el punto de vista funcional, se pueden diferenciar tres estados conformacionales en el receptor, que se comporta como una proteína alostérica (Albuquerque *et al.*, 2009; Changeux, 2012, Bouzat and Sine, 2018). En ausencia de ligando, el receptor se encuentra en estado de reposo con la compuerta hidrófoba situada en la profundidad del canal cerrada. Cuando la ACh u otro ligando se une a los sitios ortostéricos, el canal pasa rápidamente (en el rango de microsegundos) a un estado activo, abierto, permitiendo el flujo de iones. Si la exposición al agonista se prolonga en el tiempo, el canal adquiere una conformación diferente conocida como estado desensibilizado, caracterizado por tener una mayor afinidad por el agonista, pero sin permitir el flujo iónico a través del canal (Ochoa, Chattopadhyay and McNamee, 1989).

Es importante comprender estos mecanismos por los que el receptor nicotínico es modulado por diferentes moléculas, tanto endógenas (ej. hormonas) como exógenas

(ej. toxinas o moléculas de uso clínico) debido a que los nAChR de tipo muscular se encuentran directamente en contacto con los componentes plasmáticos de la sangre. Por el contrario, los receptores neuronales se encuentran parcialmente protegidos por la barrera hematoencefálica y hematonerviosa (Alberola-Die *et al.*, 2019a). Lo que es más, este conocimiento es fundamental para establecer la base del desarrollo de nuevos compuestos terapéuticos, más eficientes y específicos en la modulación de la función del nAChR y, por ende, con menos efectos secundarios; con objeto de tratar procesos patofisiológicos relacionados con disfunciones de este receptor.

1.1.2 CANAL DE CLORURO ACTIVADO POR CALCIO

Durante la primera mitad de la década de 1980 se describió en ovocitos de *Xenopus laevis* un canal de Cl^- activado por Ca^{+2} citoplasmático (*Calcium-activated chloride channels*, CaCC) (Miledi, 1982; Barish, 1983). La despolarización de la membrana celular activa canales de Ca^{+2} voltaje dependientes, permitiendo la entrada de iones Ca^{+2} al interior citoplasmático a favor de gradiente electroquímico. Este acontecimiento se asocia a variedad de procesos intracelulares entre los que se incluyen la contracción muscular, la secreción de neurotransmisores, la expresión génica, la modulación de la excitabilidad de la membrana, el crecimiento de neuritas, etc (Catterall, 2011). En algunas células, como los ovocitos de *Xenopus*, este incremento del Ca^{+2} citoplasmático, bien por la despolarización o por la activación de receptores acoplados a proteínas Gq activa un canal de Cl^- , que es responsable de una corriente de salida mediada por iones Cl^- . La retirada del Ca^{+2} del medio que baña la célula elimina la corriente de Cl^- evocada por la despolarización, mientras que un aumento de la $[\text{Ca}^{+2}]$ la potencia.

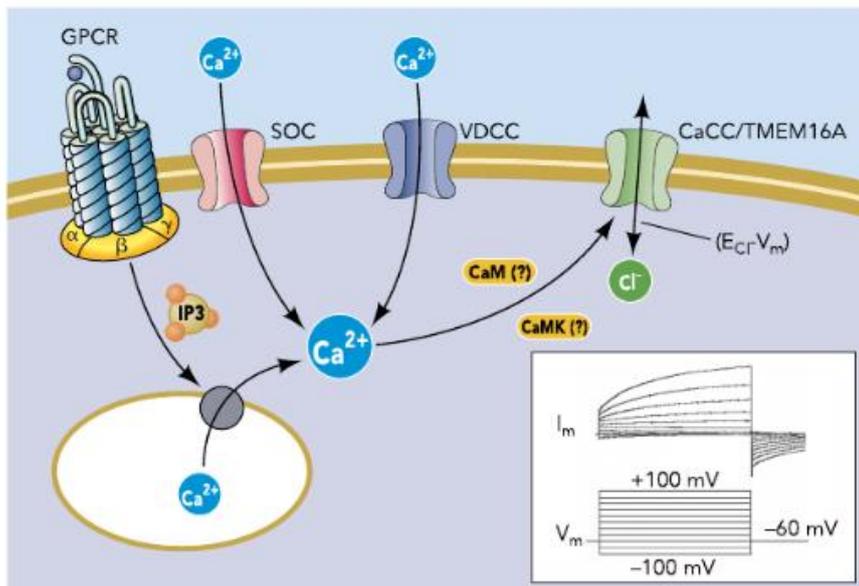


Figura 2. Activación de canales de Cl⁻ dependientes de Ca⁺² (CaCCs). CaCCs son activados por el incremento de Ca⁺² citoplasmático derivado de la activación de canales de Ca⁺² voltaje dependientes (VDCCs) principalmente, pero también por el vaciado de Ca⁺² contenido en el retículo endoplasmático, el cual a su vez activa a los canales de Ca⁺² operados por depósitos (SOCs). Este incremento, en definitiva, de Ca⁺² abre los CaCCs ocurriendo la entrada o salida de Cl⁻ dependiendo de la diferencia entre el potencial de equilibrio del Cl⁻ (variable en distintos tipos celulares) y el potencial en reposo de la membrana. El recuadro muestra un registro de corrientes CaCC (arriba) en respuesta a diferentes potenciales de membrana (abajo). La actividad del canal aumenta frente a la despolarización de la membrana y disminuye cuando el potencial de membrana retorna a valores negativos (Ferrera, Caputo and Galletta, 2010).

Con el tiempo se han ido encontrando CaCCs en múltiples tipos celulares, incluyendo fibras musculares, adipocitos, hepatocitos y linfocitos, entre otros. Ello involucra a los CaCCs en diferentes funciones fisiológicas como es la secreción epitelial, excitabilidad del músculo cardíaco y de neuronas, transducción olfativa, regulación del tono vascular y modulación de la respuesta a la luz por los receptores (Hartzell, Putzier and Arreola, 2005). Debido a esto, alteraciones de los CaCCs se relacionan con numerosas enfermedades, incluyendo la fibrosis quística (Verkman and Galletta, 2009), hipertensión (Wang *et al.*, 2015), diarrea (Thiagarajah, Donowitz, and Verkman, 2015), e incluso cáncer (Galindo and Vacquier 2005). Por tanto, no es de extrañar el creciente interés científico de encontrar posibles reguladores de los CaCCs. En su mayoría se han identificado inhibidores, pero también activadores que prometen ser especialmente beneficiosos como terapéuticos (Huang *et al.*, 2018).

1.1.3 CANAL DE CLORURO CIC

Los canales de cloruro CIC son estructuralmente y funcionalmente muy diferentes de los canales dependientes de ligando, como los nAChRs; y los canales de Cl⁻ activados por Ca⁺². La estructura de estos canales fue descrita inicialmente para los de electroplaca de *Torpedo marmorata* (Jentsch, Steinmeyer and Schwarz, 1990), denominados CIC-0, pero con el paso de los años se han ido descubriendo en distintos tejidos de organismos tan dispares como los animales, plantas, levaduras, arqueobacterias y eubacterias (Jentsch *et al.*, 1999). En mamíferos, hasta la fecha se han descrito 9 CIC diferentes (Jentsch *et al.*, 2002). De acuerdo con los estudios de homología estos pueden agruparse en tres ramas. Los miembros de la primera rama (CIC-1, CIC-2, CIC-Ka y CIC-Kb) ejercen su función en la membrana plasmática, donde también se localiza CIC-0; mientras que los miembros de las otras dos ramas

(CIC-3, CIC-4 y CIC-5 en una, CIC-6 y CIC-7 en otra) actúan primordialmente en las membranas intracelulares.

Esta distribución se asocia a una serie de funciones relacionadas con el transporte de cargas y de materia. En este sentido, a nivel de membrana plasmática las corrientes de Cl^- son importantes para la regulación de la excitabilidad nerviosa y muscular (Koch *et al.*, 1992), así como para el transporte de sal y agua a través del epitelio (Estévez *et al.*, 2001), siendo relevantes para el mantenimiento del volumen celular (Duan *et al.*, 1997). A nivel intracelular el transporte de Cl^- se piensa que participa en la compensación de cargas necesaria para la acidificación de varios compartimentos intracelulares (Borsani *et al.*, 1995).

En lo que respecta a su estructura, los canales CIC son dímeros, constituidos por dos subunidades idénticas, cada una de las cuales encierra un poro. Estos poros se abren frente a la despolarización de la membrana plasmática, en un proceso voltaje-dependiente muy rápido (fracciones de milisegundo). Su actividad es independiente, pero pueden ser cerrados por una compuerta común, de carácter lento (actúa con una constante de tiempo de segundos) y abierta durante la hiperpolarización (Estévez and Jentsch, 2002). Es así que en los registros de este canal de “doble cañón” se pueden llegar a distinguir 3 niveles de corriente tal y como ilustra la Figura 2.

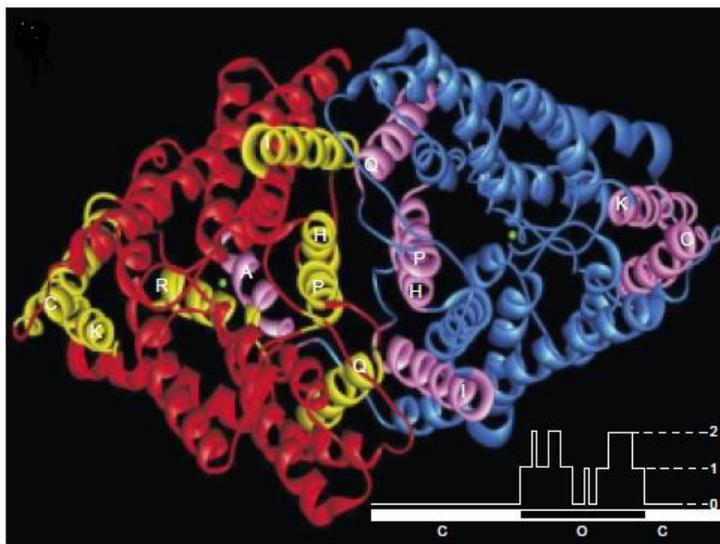


Figura 3. Estructura cristalina y registro del canal CIC (Dutzler *et al.*, 2002). Los dos monómeros del dímero son mostrados en rojo y azul. Los iones Cl^- en sus respectivos sitios de unión son mostrados como esferas verdes. Las hélices que están uniéndose a ambas subunidades son mostradas en diferentes colores. En el registro se observan fluctuaciones en los niveles de corriente en función del tiempo. Cuando la compuerta común está cerrada (indicada por “C” en la línea inferior) no hay corriente. Cuando la compuerta está abierta (indicado por “O”),

aparecen tres niveles de corriente: 0, cuando las compuertas de los poros individuales están cerradas; 1, cuando un poro está abierto; 2, cuando ambos poros están abiertos.

La alteración de la estructura de los canales CIC en variedad de mutaciones manifiesta la importancia fisiológica de estos canales, teniendo un papel central en enfermedades congénitas humanas. Por ejemplo, la mutación del canal CIC-1, expresado en fibras de músculo esquelético, ocasiona miotonia, una hiperexcitación de las fibras musculares (Kock *et al.*, 1992). En caso de daño en CIC-Kb, canal específico del riñón, se desencadena una dramática pérdida de sales vía renal en el conocido como síndrome de Bartter (Simon *et al.*, 1997). En este mismo tejido, la mutación de CIC-5 es la causante de la enfermedad de Dent, un desorden caracterizado por la proteinuria e hipercalciuria, lo que desencadena normalmente en piedras en los riñones, nefrocalcinosis y fallo renal (Lloyd *et al.*, 1996).

El canal CIC-0 ha servido como paradigma de los canales CIC a lo largo de su historia (Jentsch *et al.*, 2002), siendo por ello el candidato de referencia para investigaciones que aborden la estructura y funcionalidad de esta familia de canales en iónicos.

1.2 PEIMINA: POTENCIAL TERÁPICO EN LA MEDICINA TRADICIONAL CHINA

La peimina, también conocida como verticina y verticinona, es un alcaloide que constituye el compuesto bioactivo predominante en *Frillitaria* (familia Liliaceae), planta utilizada ampliamente en la medicina tradicional China como antitusivo y expectorante (Chen *et al.*, 2007). Más concretamente, la peimina se concentra en los bulbos subterráneos de esta planta, conocidos en la región como Beimu. Los más extendidos en su uso son aquellos pertenecientes a *F. cirrhosa* y *F. thunbergii* (Chuan Beimu y Zhe Beimu respectivamente), en ocasiones combinados con bulbos de otras especies de *Frillitaria* (Da-Cheng *et al.*, 2013; Tang and Eisenbrand, 2013).

La estructura de la peimina fue descrita en la década de 1960 (Ito *et al.*, 1963), tan solo 30 años después de se hubiera aislado por primera vez en bulbos de *F. cirrhosa* (Chou y Chen, 1932). La peimina es pues, de acuerdo con la bibliografía, un glicoalcaloide con fórmula $C_{27}H_{45}NO_3$ (pl 12,28, pKa 9,5), caracterizado por una solubilidad moderada y carga positiva a pH fisiológico (Chemicalize, 2019).

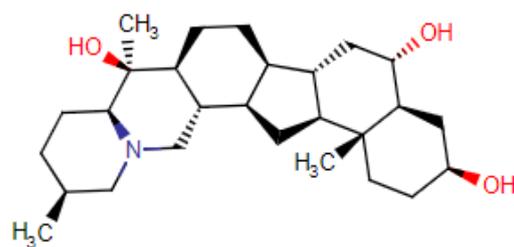


Figura 4. Estructura de Peimina (Chemicalize, 2019).

De acuerdo con la Ley de Salud China N°51 se acepta *Frillitaria* como planta no tóxica apta para su consumo con objeto de aliviar síntomas gripales, entre los cuales se destaca como antitusivo, antiinflamatorio y analgésico. (Law Pharmnet, 2002). Los mecanismos por los que se dan estos efectos permanecen desconocidos, aunque algunos estudios apuntan a una activación de receptores opiáceos por parte de la Peimina (Xu *et al.*, 2008). Se ha verificado, además, su participación en la supresión de la actividad de nociceptores mediante el bloqueo de canales Nav1.7, así como del sistema inmune (y por tanto de la inflamación) mediante el bloqueo de canales Kv1.3 (Xu *et al.*, 2016).

Los efectos farmacológicos de la peimina no se limitan al aparato respiratorio, sino que se ha encontrado ser beneficiosa en variedad de enfermedades (Yin *et al.*, 2019). Entre ellas se destaca su efecto antitumoral, impidiendo la proliferación celular e induciendo su apoptosis en leucemia, cáncer de pecho, de pulmón e intestinales (Chen and Chen, 2012; Tang and Tang, 2012; Qi, Liao and Xu, 2017). Lo que es más, se ha observado su capacidad de revertir las resistencias adquiridas por las líneas celulares frente al tratamiento quimioterápico (Tang *et al.*, 2015; Gu *et al.*, 2012). También se ha observado que afecta a la actividad eléctrica del corazón al inactivar canales hERG, lo que denota la necesidad de controlar las dosis administradas con fines terapéuticos (kan *et al.*, 2017).

Esta diversidad de efectos de la peimina puede considerarse como un riesgo terapéutico debido a la poca especificidad que manifiesta, lo que se traduce en efectos secundarios adversos. Sin embargo, cabe incidir en este punto en las palabras del médico Paracelso, quien ya en el siglo XVI observó que la toxicidad de las sustancias no reside en el compuesto en sí sino en la dosis en la que se suministra.

“Lo que hay ahí, no es veneno: todas las cosas son veneno, y nada es sin veneno.

Solamente la dosis determina que una cosa sea o no veneno.” – Paracelso

(Santos, 2003)

Por tanto, es de importancia estudiar si este tipo de fármacos utilizados en la medicina tradicional interaccionan a reducidas dosis con canales iónicos de relevancia en enfermedades de manera específica, es decir, sin efectos secundarios fruto de otro tipo de interacciones. Se convierten en tal caso en potenciales medicamentos de uso hospitalario como fue el caso, por ejemplo, del curare: potente veneno utilizado por los pueblos indígenas de América del Sur, pero también utilizado (algunos análogos estructurales) como relajantes musculares durante la anestesia quirúrgica (Raghavendra, 2002).

Los estudios de la peimina en esta línea comenzaron en el Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología de la Universidad de Alicante, dónde se observó que la co-aplicación de 10 μM ACh con concentraciones crecientes de peimina mostraban el bloqueo reversible de los receptores nicotínicos, de una forma dosis dependiente. La curva dosis-inhibición reveló que la inhibición del 50% de los nAChRs (CE_{50}) se producía a una concentración de 3 μM peimina, un valor considerablemente bajo y, en todo caso, muy inferior al previamente descrito para el bloqueo de los canales de Na^+ o K^+ (Arberola-Die *et al.*, 2019b).

2.- OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo fue dilucidar posibles interacciones de la peimina, en el rango micromolar, con canales iónicos de relevancia terapéutica: nAChR, CIC-0 y CaCC mediante técnicas electrofisiológicas. Este objetivo principal incluye varios subobjetivos específicos, que deben alcanzarse para lograr el objetivo final:

- a) Aprender cómo se obtienen y mantienen en cultivo los ovocitos de *Xenopus*
- b) Realizar la técnica de microtransplante funcional de receptores nAChR y canales CIC-0 de la electroplaca de *Torpedo* a la membrana de ovocitos de *Xenopus*.
- c) Familiarizarse con los equipos electrofisiológicos necesarios para registrar corrientes de membrana en condiciones de fijación de voltaje.
- d) Conocer la metodología para la activación de canales activados por voltaje y ligando y, en su caso, el diseño de protocolos adecuados para activar los canales objeto de estudio.
- e) Conocer cómo se analizan las corrientes registradas y cómo pueden representarse, utilizando programas específicos para el análisis y representación de estos datos.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 PURIFICACIÓN Y RECONSTRUCCIÓN DE nAChRs

La electroplaca de *Torpedo marmorata* se utilizó para obtener los nAChRs dada su elevada concentración en ese tejido, lo que facilita su purificación en relación con otros tejidos (Morales *et al.*, 1995).

El proceso de purificación del nAChR de la electroplaca de *Torpedo* y su reconstitución en matrices lipídicas, formando proteoliposomas, se realizó por el grupo del Prof. J.M. González-Ros (Universidad Miguel Hernández, Elche), siguiendo el protocolo descrito por Martínez-Carrion *et al.* (1984). El resultado final son vesículas unilamelares con nAChRs suspendidos en tampón HEPES 10mM, a partir del cual se preparan alícuotas que se almacenan en nitrógeno líquido. Los canales de cloruro CIC-0 co-purifican ocasionalmente con los nAChRs. Aunque la concentración de CIC-0 en los proteoliposomas es mucho menor que la de los nAChRs, su actividad puede detectarse electrofisiológicamente (Ivorra *et al.*, 2002).

3.2 EXTRACCIÓN DE OVOCITOS DE *Xenopus laevis*

Los ovocitos de *Xenopus laevis* (anuro sudafricano de la familia Pipidae) fueron seleccionados como modelo experimental, siendo capaces de incorporar a sus membranas nAChRs microinyectados sin alteraciones en los mismos (Morales *et al.*, 1995), además de poseer en su membrana CaCCs nativos (Miledi, 1982).

Las hembras de *X. laevis* producen de manera continua y asincrónica ovocitos, lo que permite tenerlos siempre a disposición del equipo de investigación. Lo que es más, su gran tamaño (1-1,3 cm) las hace células fácilmente manejables (Miledi *et al.*, 1989).

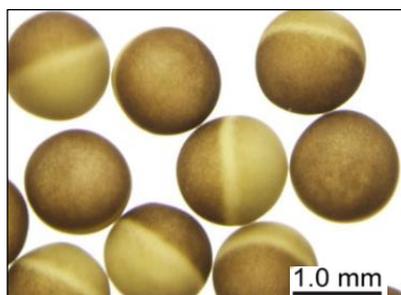


Figura 5. Ovocitos de *Xenopus laevis* en estadio VI (Cristofori-Armstrong *et al.*, 2015).

Las hembras del anuro fueron proporcionadas por Harlan Interfauna Ibérica S.L. (Barcelona, España) y el Centro Nacional de Investigaciones Científicas (Montpellier, Francia). Se procedió con su anestesia sumergiéndolas en un baño de hielo que

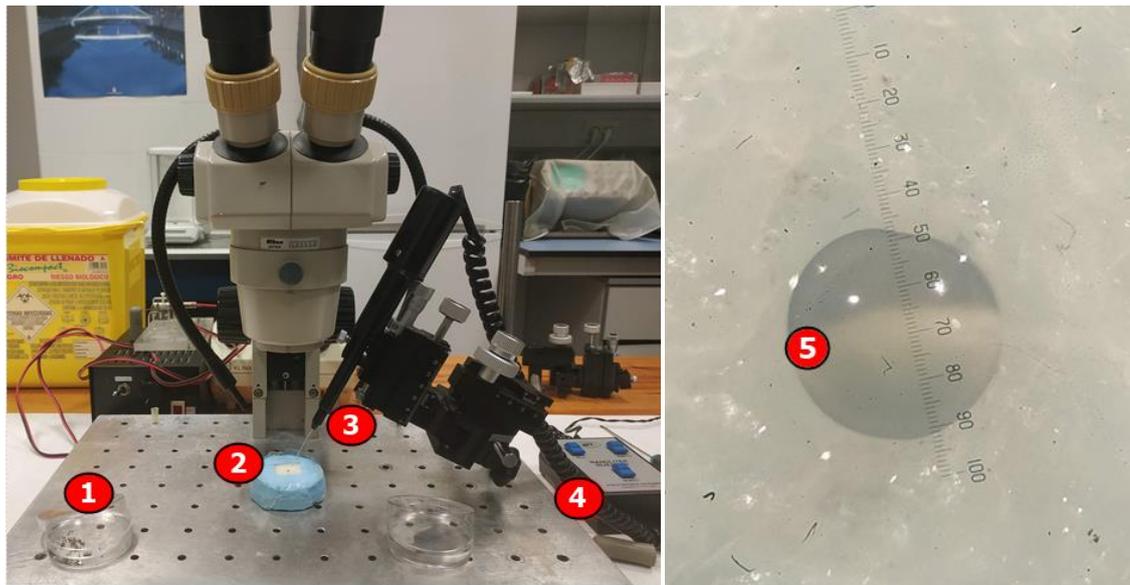
contenía MS-222 al 0,17% durante 30 minutos. Posteriormente, se suspendió el anuro sobre un lecho de hielo y se le practicó una incisión en la zona abdominal para extraer una porción del lóbulo ovárico. El manejo del animal fue llevado a cabo de acuerdo con las directrices de la Unión Europea para el cuidado y uso de animales en experimentación. Así mismo, el protocolo animal llevado a cabo en esta investigación fue aprobado por el comité ético de la Universidad de Alicante.

El lóbulo ovárico se sumergió en una solución estéril de un medio Barth modificado (NaCl 88 mM, KCl 1 mM, NaHCO₃ 2,40 mM, Ca(NO₃)₂ 0,33 mM, CaCl₂ 0,41 mM, MgSO₄ 0,82 mM, HEPES 10 mM, ajustado a un pH de 7,4 por 20 min a 121°C y luego suplementado con penicilina 100 UI.ml⁻¹ y estreptomycin 0,1 mg.ml⁻¹). Se escogieron los ovocitos que se encontraban en el estadio V y VI de Dumont (Dumont, 1972) y se les separó el epitelio ovárico interno mediante un proceso mecánico. Las células resultantes fueron mantenidas en una solución Barth modificada a una temperatura de 15-16°C hasta su uso.

3.3 MICROINYECCIÓN DE OVOCITOS

La microinyección de nAChR y CIC-0 de *Torpedo marmorata* en los ovocitos se realizó con un nanoinyector electrónico (A203XVZ, WPI, Inglaterra) cuyas micropipetas de inyección con diámetro en la punta de 20-30 µm se construyeron mediante el estiramiento de un capilar de borosilicato (PUL-1, WPI, Inglaterra).

Una alícuota de proteoliposomas conteniendo nAChRs purificados y CIC-0 se descongeló durante 10-15 min en hielo y se re-homogeneizó mediante sonicación en un baño durante 3 minutos. Posteriormente, 1-2 µl de la muestra se succionó dentro de la micropipeta de inyección, parcialmente rellena con aceite mineral. Con la ayuda de un micromanipulador manual (M3301, WPI, Inglaterra) y una lupa estereoscópica (SMZ-1, Nikon, Japón) se inyectaron 100 nl de la muestra en el polo vegetal de cada ovocito.



A

B

Figura 6. Proceso de microinyección de los ovocitos con los proteoliposomas. Los ovocitos separados del epitelio ovárico (**A1**) fueron colocados individualmente en un soporte de Parafilm (**A2**), donde bajo la visión de una lupa estereoscópica (SMZ-1, Nikon, Japón) se maniobró aproximando un capilar de vidrio con la muestra cargada (**A3**) a la zona de inyección (**B5**). El nanoinyector (A203XVZ, WPI, Inglaterra) (**A4**) permitió la inyección de dos pulsos de 50 nl en cada ovocito.

3.4 MÉTODOS PARA EL REGISTRO ELETROFISIOLÓGICO EN OVOCITOS

Los ovocitos se colocaron de uno en uno en una cámara de metacrilato con una capacidad de 150 μL bajo el control visual de una lupa estereoscópica (GZ4, Leica, Alemania). Por esta cámara se hacen difundir distintas soluciones a una velocidad de flujo de $\sim 18 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, mantenida constante gracias a la succión ejercida por la bomba de vacío acoplada a la cámara. En dicha cámara se colocó un anillo de *Tygon*[®] como soporte del ovocito. Las disoluciones de perfusión se introdujeron en matraces erlenmeyer de 50-100 ml colocados sobre una repisa a un metro de altura. En cada uno se introdujo un capilar de vidrio de 2 mm de calibre conectado a un tubo de *Tygon*[®] que terminaba en electroválvulas de 3 vías (The Lee Co., EEUU) que controlan el paso de cada solución a la cámara gracias a su conexión a una unidad de control conectada a un ordenador. Para evitar vibraciones que pudiesen dañar la membrana del ovocito, el equipo mencionado se colocó sobre una mesa antivibratoria. Además, la mesa de registro se introdujo en una jaula de Faraday, para minimizar las interferencias de radiación electromagnética externa, que incrementan el ruido eléctrico del registro.

Para medir las corrientes evocadas en la membrana del ovocito se utilizaron electrodos de hilo de plata clorurado (Ag/AgCl) conectados a microelectrodos obtenidos a partir del estiramiento de capilares de vidrio de borosilicato (con filamento interno de 1,5 mm de diámetro externo, 0,84 mm de diámetro interno y 100 mm de largo; 1B150F-4, WPI, U.K.). La punta de los microelectrodos se dobló en un ángulo de 45° empleando una microforja, para facilitar su entrada en los ovocitos y minimizar el daño durante el registro de las corrientes. La resistencia final de la punta de los microelectrodos fue de 1,5 a 2 MΩ para el electrodo de voltaje y de 1,5-3 MΩ, para el electrodo de corriente. Los microelectrodos de voltaje fueron rellenos con KCl 3 M y los de corriente con acetato potásico 3 M y se conservaron, por separado, en recipientes rellenos de dichas soluciones. Previamente a su utilización para el registro, los electrodos se lavaron con abundante agua destilada, fueron sellados con glicerol, para evitar la formación de cristales, y, finalmente, se le introdujeron los cables de plata clorurada (Ag/AgCl).

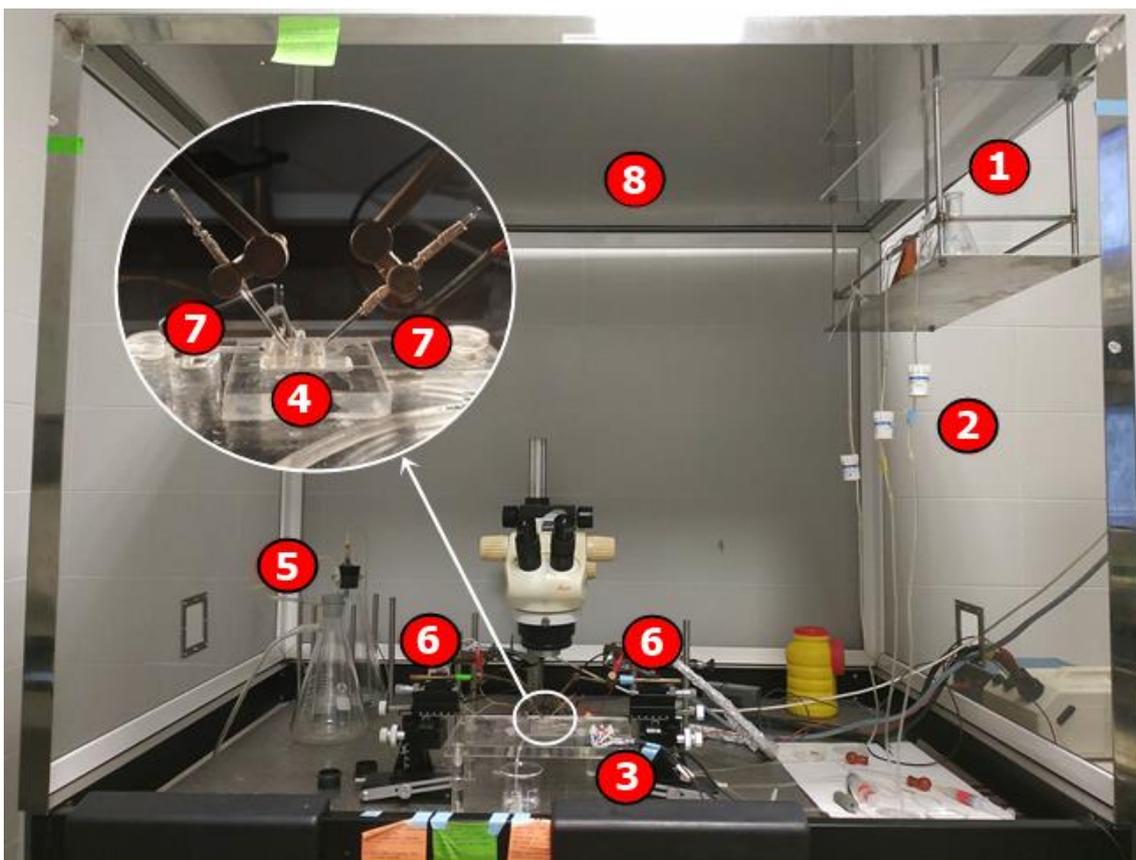


Figura 7. Set-up para el registro de corrientes en ovocitos. Las disoluciones (1) que abastecen el sistema de perfusión (2) son dirigidas mediante 3 electroválvulas (3) hacia la cámara (4) en la que se encuentra inmerso el ovocito. El flujo de las disoluciones es mantenido constante mediante una bomba de vacío (5). Haciendo uso de dos micromanipuladores (6) se aproximan los electrodos de voltaje y corriente (7) para ser colocados correctamente en el

ovocito. La jaula de Faraday (8) que envuelve el set-up permite obtener un registro más limpio al minimizar el ruido eléctrico externo.

3.5 FIJACIÓN DE VOLTAJE

La técnica de fijación de voltaje, desarrollada por Cole y Marmont (1930), permite controlar el potencial de membrana (V_m) y poder medir las corrientes necesarias para mantenerlo en un valor deseado, lo que posibilita conocer los cambios de conductancia de la membrana en respuesta a distintos estímulos.

Para conocer el potencial de membrana se introdujo en primera instancia el electrodo de voltaje, que a su vez está conectado a un preamplificador (VF-180 Micro Electrode Amplifier, Bio Logic, Francia). Una vez conocido el V_m , se introdujo el microelectrodo de corriente, conectado a un amplificador de corriente (VF-1800 High Voltaje Amplifier, Bio Logic, Francia). Por su parte, la cámara donde se encuentra el ovocito está conectada a tierra por medio de un puente de vidrio relleno de KCl 3 M en una matriz de agar al 5%.

El valor de potencial de membrana medido en el ovocito se dirigió hacia el amplificador diferencial (CA100 Clamp Amplifier, Bio Logic, Francia) que compara el V_m con el potencial establecido por el experimentador (potencial comando, V_c). En nuestro caso el potencial V_c es -60 mV. La diferencia entre V_m y V_c es la señal de error y es proporcional a la corriente que debe ser inyectada, a través del electrodo de corriente, para fijar el potencial de la célula al valor deseado. Las corrientes de membrana junto con el V_m se monitorizaron en un osciloscopio analógico/digital (HM305, Hameg Instruments, Alemania) y mediante dos convertidores A/D (Digidata Digidata 1200, de 12 bits, y 1400A, de 16 bits, Axon Instruments, U.S.A.).

Para la realización y monitorización de los registros, se emplearon dos programas de captación y monitorización de registros electrofisiológicos: WCP versión 4.2.2 desarrollado por J. Dempster (Strathclyde Electrophysiology Software, University of Strathclyde, U.K.) y AxoScope versión 10.0.0.60 (Molecular Devices Corporation, U.S.A.).



Figura 8. Equipo para el registro de corriente en ovocitos. Vista general (derecha) de los racks donde se encuentran los ordenadores y equipo necesario para el registro. Vista en detalle (izquierda) del amplificador de corriente (1), amplificador diferencial (2), amplificador de voltaje (3), unidad de filtros (4), osciloscopios (5 y 6), convertidores A/D (7 y 8) y controlador de válvulas (9).

3.6 PROTOCOLO PARA EVALUAR EL EFECTO DE LA PEIMINA

3.6.1 En nAChRS de *Torpedo marmorata*

Los ovocitos inyectados e incubados durante un mínimo de 24 horas a una temperatura de 16,5 °C fueron colocados en la cámara de registro y superfundidos con solución RN (Ringer Normal) con atropina (NaCl 115 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 1,8 mM y HEPES 5 mM, pH 7,0 + Atropina sulfato 0,5 µM). La atropina (Sigma, St. Louis, MO, EEUU) se utiliza para bloquear las posibles respuestas muscarínicas nativas que se puedan activar en los ovocitos en presencia de ACh (Kusano, Miledi and Stinakre., 1982).

El potencial de membrana se fijó a -60 mV y, entre cada aplicación de ACh (Sigma, St. Louis, MO, EEUU), se esperó un tiempo de 12 min para minimizar el efecto de la desensibilización producida por la presencia mantenida de ACh. Este tiempo de espera se aconseja para la concentración de ACh de 100 μ M, que fue la utilizada en este estudio. Cuanto menor es la concentración de ACh más corto es el intervalo entre aplicaciones (Cobo *et al.*, 2018).

- Medida del tiempo al pico de la corriente evocada por ACh y del porcentaje de inhibición

La medida del tiempo al pico de la corriente evocada por ACh (I_{ACh}), así como a distintos tiempos de ese valor máximo de la I_{ACh} , se realizó con el software de registro WCP. La amplitud de la corriente de I_{ACh} asociada a estos tiempos permitió obtener, por otro lado, el porcentaje de corriente remanente. A partir de ese porcentaje se puede calcular el porcentaje de bloqueo de la I_{ACh} por la acción de la peimina (Sigma, St. Louis, MO, EEUU) con respecto al control, a partir de la expresión:

$$\% \text{ de Inhibición} = 100 - \left[\left(\frac{I_{ACh+P}}{I_{ACh}} \right) \times 100 \right]$$

Donde I_{ACh+P} se refiere a la corriente evocada por la co-aplicación de peimina 5 μ M y ACh 100 μ M e I_{ACh} es la corriente evocada por superfusión de sólo ACh.

- Medida de la cinética (τ) de la I_{ACh} .

La caída en la I_{ACh} es posible ajustarla a una (o varias) exponenciales, de tal manera que podemos aproximar la cinética de la corriente a la determinada por la expresión:

$$I_t = I_{pico} e^{-t/\tau}$$

Donde I_t es la amplitud al tiempo dado, I_{pico} es la amplitud de la corriente en el valor máximo de la I_{ACh} , t el tiempo dado y τ (tau) la constante de tiempo (tiempo al cual la función alcanza el 63% de su valor asintótico). Tau es un parámetro ampliamente utilizado para indicar qué tan rápido decae una función exponencial, permitiendo comparar la cinética de I_{ACh} evocada por sólo ACh con la obtenida tras la exposición del nAChR a ACh con diferentes moduladores, tal y como se ha realizado en anteriores ocasiones en el Departamento de Fisiología de la UA (Cobo *et al.*, 2018; Arberola-Die *et al.*, 2016).

El ajuste de los datos a una función exponencial, así como la obtención del parámetro Tau se realizó mediante el software de registro WCP.

3.6.2 En CaCCs de *Xenopus laevis*

Los ovocitos recién extraídos de *Xenopus laevis* fueron colocados en la cámara y superfundidos con solución RNA enriquecido en Ca^{+2} (NaCl 115 mM, KCl 2 mM, CaCl_2 1,8 mM y HEPES 5 mM, pH 7,0 + Ca^{+2} 10 mM). El enriquecimiento en Ca^{+2} tiene por objeto potenciar la activación de los CaCCs, al favorecer la entrada de Ca^{+2} al medio intracelular a través de la activación de canales de Ca^{+2} sensibles a voltaje presentes en la membrana de estas células.

El potencial de membrana se fijó a -60 mV, y se aplicaron en intervalos de 2 minutos pulsos de voltaje que llevaron el V_m inicialmente a -100 mV, para eliminar la inactivación de los canales de Ca^{+2} dependientes de voltaje y después a +20 mV. La razón de llevar el potencial de membrana a +20 mV radica en el hecho de que a este potencial se registra la mayor corriente de Ca^{+2} hacia el interior celular (necesario, como se ha explicado anteriormente, para la activación de los CaCCs).

Después de completar con cada ovocito los registros establecidos por el protocolo, se incubó durante 2 minutos en un medio sin Ca^{+2} y suplementado con Mn^{+2} 10mM, con el fin de bloquear cualquier corriente de Ca^{+2} a través de la membrana del ovocito.

- Medida del porcentaje de inhibición

El porcentaje de inhibición se obtuvo de igual manera que en el receptor nicotínico, a partir de la expresión:

$$\% \text{ de Inhibición} = 100 - \left[\left(\frac{I_{CaCC+P}}{I_{CaCC}} \right) \times 100 \right]$$

Donde $I_{CaCC + P}$ se refiere a la corriente evocada por los canales CaCC tras la incubación durante 2 minutos en peimina a concentraciones de 5 μM , 500 o 50 nM, e I_{CaCC} es la corriente evocada por los canales CaCC antes de la incubación con peimina.

3.6.3 En CIC-0 de *Torpedo marmorata*

Los ovocitos inyectados con proteoliposomas e incubados durante un mínimo de 24 horas a una temperatura de 16,5 °C fueron colocados en la cámara y superfundidos con solución RNA. El potencial de membrana se fijó a -60 mV, y se aplicaron en intervalos de 2 minutos rampas de voltaje hiperpolarizante-despolarizante (5 mV/sec), desde -20 a -120 y vuelta a -20 mV. De esta manera se obtiene un registro que abarca la apertura y cierre de ambas compuertas voltaje-dependientes, lenta y rápida, del canal. (Ivorra *et al.*, 2002)

Después de completar con cada ovocito los registros establecidos por el protocolo, se incubó durante 2 minutos en 1^{-} 115 mM, con el fin de bloquear la corriente evocada por los canales CIC-0, dado que el 1^{-} no permea por este canal.

- Medida del porcentaje de inhibición

El porcentaje de inhibición se obtuvo a partir de la expresión:

$$\% \text{ de Inhibición} = 100 - \left[\left(\frac{I_{CIC-0+P}}{I_{CIC-0}} \right) \times 100 \right]$$

Donde $I_{CIC-0+P}$ se refiere a la corriente evocada por los canales CIC-0 tras la incubación en peimina 5 μ M durante 2 minutos, e I_{CIC-0} es la corriente evocada por los canales CIC-0 antes de la incubación con peimina.

3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los resultados obtenidos se utilizó, primeramente, Excel 2016 como herramienta para el almacenamiento y ordenamiento de los datos. Mediante el software Origin 8 (OriginLab Corp, Northampton, MA, EE. UU.) pudieron ser representados en las figuras y gráficas correspondientes. Por último, los datos fueron procesados estadísticamente mediante el software SigmaPlot 12.0 (Systat Software, San José, C.A) determinándose:

- La media aritmética y el error estándar de la media (SEM).
- Diferencias entre poblaciones que se ajustan a una distribución normal, aplicando pruebas t de Student (*t-test*). Se aceptaron como valores significativos aquellos con un p-valor inferior a 0,05.

3.8 PLAN DE TRABAJO

El presente Trabajo de Fin de Grado se realizó en el transcurso de los 5 meses comprendidos entre enero y mayo de 2019, siendo efectuada la parte experimental en el laboratorio de Fisiología adscrito al Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología de la Universidad de Alicante (España).

Las actividades que se llevaron a cabo vienen recogidas a continuación en un cronograma:

1. Lectura de artículos científicos proporcionados por el tutor.
2. Elaboración de la estructura y trabajo a seguir.
3. Familiarización con el manejo del equipo de laboratorio.
4. Protocolo de evaluación del efecto de la peimina sobre nAChRs.
5. Protocolo de evaluación del efecto de la peimina sobre CaCCs.
6. Protocolo de evaluación del efecto de la peimina sobre CICs.

7. Análisis de datos y resultados.
8. Búsqueda bibliográfica acorde con el desarrollo escrito del trabajo.
9. Redacción y elaboración del TFG.
10. Correcciones por parte del tutor.
11. Entrega.

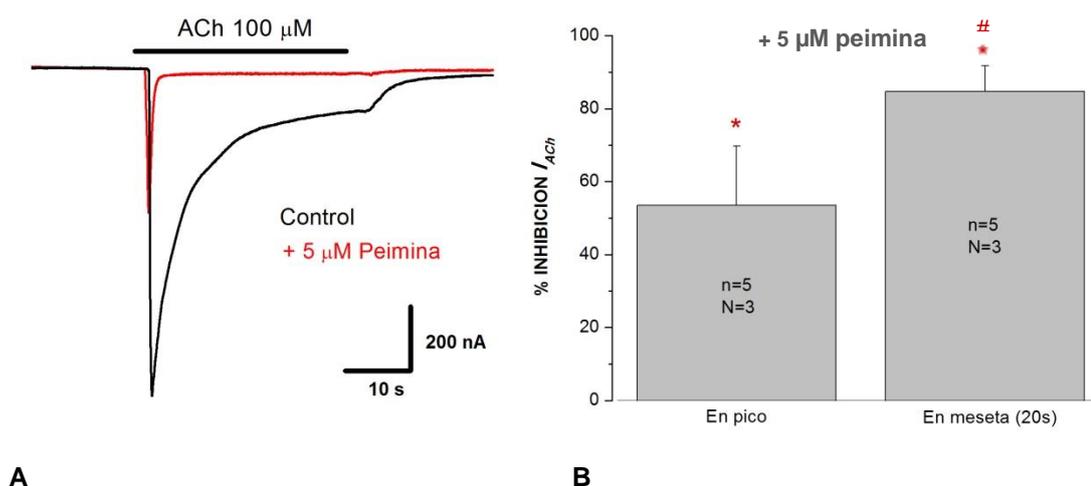
	AÑO	2018																													
	MESES	Enero					Febrero					Marzo					Abril					Mayo					Junio				
	SEMANAS	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
ACTIVIDADES POR SEMANA	1																														
	2																														
	3																														
	4																														
	5																														
	6																														
	7																														
	8																														
	9																														
	10																														
	11																														

4.- RESULTADOS

4.1 EFECTO DE LA PEIMINA EN nAChR

4.1.1 La peimina inhibe la I_{ACh}

La superfusión de ACh 100 μ M en ovocitos, previamente microinyectados con nAChRs purificados y con el potencial de membrana fijado a -60 mV provocó la apertura de los canales iónicos que se incorporaron a la membrana del ovocito, generando una corriente de entrada (I_{ACh} , ver Control Figura 9A), resultando en la entrada de iones Na^+ y la salida de iones K^+ . La superfusión de ACh 100 μ M junto con peimina 5 μ M en estas células provocó la inhibición de la I_{ACh} en un $53,4 \pm 16,3$ % ($n=5$; $N=3$) en el pico, y en un $84,7 \pm 6,9$ % ($n=5$; $N=3$) en la fase de meseta del registro, medida a los 20 s del pico (Figura 9A). Estos resultados fueron estadísticamente significativos respecto del control ($p<0,05$ en *t-test*) así como entre ellos ($p<0,05$ en *t-test* *pareado*) (Figura 9B).



A **B**

Figura 9. Inhibición de la I_{ACh} ejercida por peimina. (A) Se representa la corriente registrada en nAChRs en función del tiempo. El registro de color negro de la I_{ACh} corresponde a un control representativo, obtenido por la superfusión de ACh 100 μ M sola. Su aplicación junto con peimina 5 μ M en el mismo ovocito se representa en color rojo. La barra horizontal mostrada encima del registro representa el tiempo de aplicación de ACh a la concentración indicada, sola o co-aplicada con peimina. En esta y las siguientes figuras, el potencial fijado (V_c) para las I_{ACh} fue -60 mV, y las corrientes de entrada aparecen como deflexiones negativas. (B) Se muestra un diagrama de barras que se corresponde con los valores medios obtenidos de porcentaje de inhibición de la I_{ACh} en presencia de peimina 5 μ M en el pico de la corriente y en la meseta (a los 20 s del pico). En este y los próximos gráficos de columnas, el número de ovocitos (n) y el número de *Xenopus* donadores (N) empleado en cada ocasión se muestra adjunto. . El asterisco indica que la peimina inhibe significativamente la I_{ACh} ($p<0,05$ en *t-test*

de muestra única frente a un valor de 0) y la almohadilla que el porcentaje de inhibición en la meseta es mayor que en el pico de la I_{ACh} . ($p < 0,05$ en *t-test* *pareado*).

4.1.2 La peimina reduce el tiempo al pico de la I_{ACh}

El tiempo al pico, o tiempo necesario para alcanzar el valor máximo de la I_{ACh} , se midió desde el momento de inicio de la activación en presencia de ACh 100 μM sola o co-aplicada con peimina 5 μM . La co-aplicación con peimina propició que la I_{ACh} alcanzara antes su valor máximo (control, $1667,1 \pm 382,5$ ms; co-aplicación con peimina, $802,6 \pm 368,0$ ms), resultado respaldado por el análisis estadístico llevado a cabo (Figura 10).

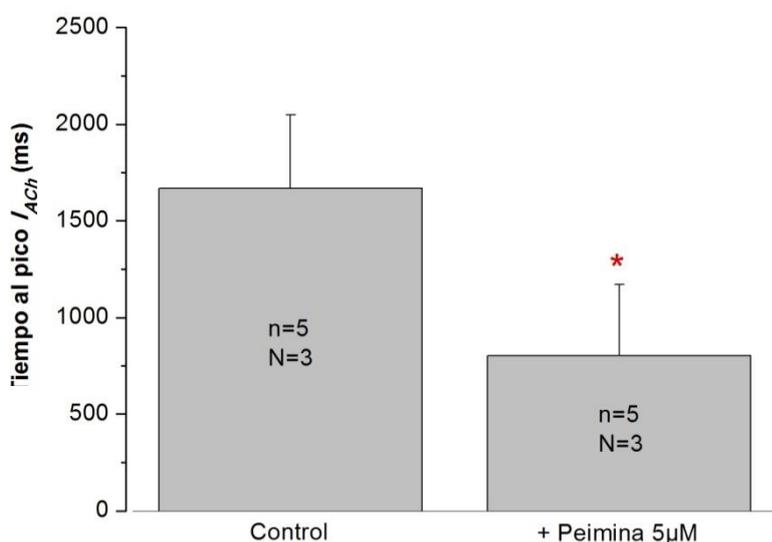


Figura 10. Reducción del tiempo al pico de la I_{ACh} . Se muestra un diagrama de barras que se corresponde con los valores medios obtenidos de tiempo al pico de la I_{ACh} en presencia de ACh 100 μM sola (control) o co-aplicada con peimina 5 μM . El asterisco indica diferencias significativas entre ambos valores ($p < 0,05$ en *t-test* *pareado*).

4.1.3 La peimina acelera la cinética de desensibilización de la I_{ACh}

La obtención del parámetro τ mediante el ajuste de la I_{ACh} a una función exponencial permitió conocer la cinética de desensibilización de las I_{ACh} evocadas por ACh 100 μM sola o en co-aplicación con peimina 5 μM . El análisis estadístico realizado mostró diferencias significativas en el valor de este parámetro en los controles (ACh 100 μM) respecto del obtenido en co-aplicación con peimina (control, $\tau = 5050,9 \pm 804,4$ ms; co-aplicación con peimina, $\tau = 826,1 \pm 265,1$ ms; obsérvense las distintas cinéticas de desensibilización de los registros mostrados en la Figura 9) tal y como se representa en la Figura 11.

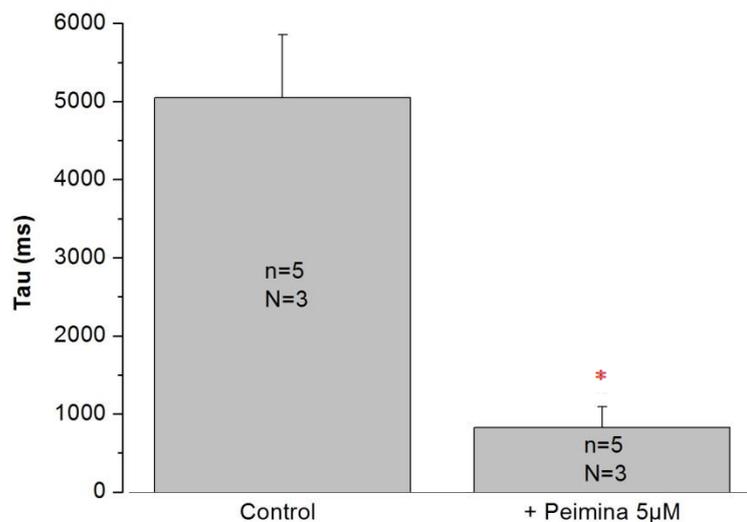


Figura 11. Reducción de la Tau del proceso de desensibilización en presencia de peimina. Se muestra un diagrama de barras que se corresponde con los valores medios obtenidos de la constante de tiempo Tau de desensibilización en presencia de ACh 100 µM sola (control) o co-aplicada con peimina 5 µM. El asterisco indica diferencias significativas entre ambos valores ($p < 0,05$ en *t-test* *pareado*).

4.2 EFECTO DE LA PEIMINA EN CaCC

4.3.1 La peimina potencia la I_{CaCC}

Mediante la aplicación de pulsos de voltaje a distintos potenciales, manteniendo como potencial de fijación -100 mV, se obtiene la máxima actividad los canales de Cl^- dependientes de Ca^{+2} a un potencial de +20 mV. Esta corriente de Cl^- se registra como una deflexión positiva debido al flujo de entrada de iones Cl^- al espacio citoplasmático (Figura 12, +20 mV), que evoca una corriente de salida (positiva) y está mediada por la entrada de Ca^{+2} inducida por la despolarización de la membrana, ya que se puede bloquear eliminando el Ca^{+2} del medio extracelular (ver Figura 13, registro en azul). Esclarecido, de este modo, el protocolo del voltaje ideal para el estudio de CaCCs, se procedió con la incubación del ovocito durante 2 minutos en peimina 5 µM. Puesto que a dosis de 5 µM se observan efectos evidentes sobre nAChR, se decidió emplear dicha concentración para probar el efecto de la peimina sobre los otros canales abordados en este estudio. Esta incubación provocó la potenciación de la I_{CaCC} en un $356,0 \pm 86,6$ % ($n=7$; $N=2$) (Figura 13, + 5 µM peimina). En vistas de este singular resultado, significativamente diferenciado del control ($p < 0,05$ en *t-test*), se decidió a ahondar en el estudio de este canal reduciendo la concentración de peimina con objeto de discernir la mínima dosis capaz de potenciar la actividad de CaCCs. Se

procedió, por tanto, con la incubación en peimina a 500 nM y 50 nM, obteniéndose unos porcentajes de cambio de $187,2 \pm 39,1 \%$ ($n=5$; $N=2$) y $147,9 \pm 30,9 \%$ ($n=9$; $N=2$) respectivamente, valores que resultaron no significativos respecto del control (Figura 14). Se observó, por otro lado, una aparente reducción en el tiempo al pico cuando se exponía el canal a peimina (Figura 13).

El periodo de incubación fue establecido de forma arbitraria, por la falta de información en lo que respecta a cuánto tiempo requiere el modulador para actuar sobre este canal. Debido al limitado espacio temporal en el que tuvo lugar esta investigación, no se profundizó en cómo varía la modulación ejercida por la peimina cuando se acota o prolonga el periodo de exposición del canal a este compuesto. Queda, por tanto, pendiente para futuros experimentos.

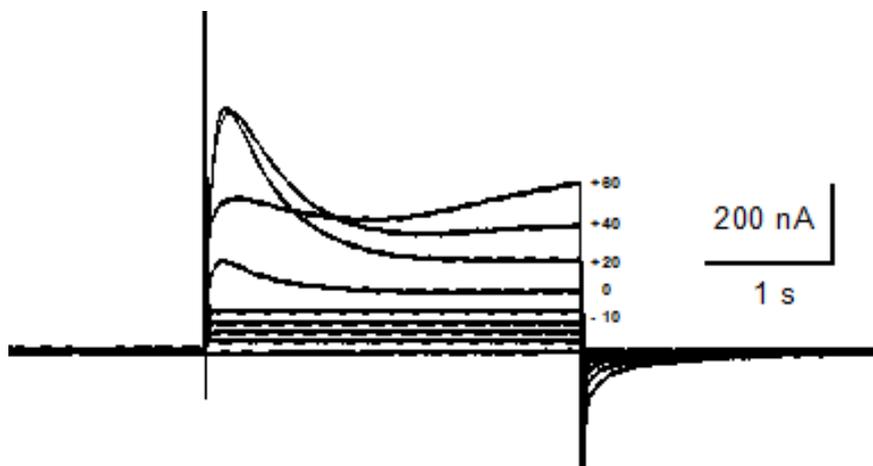


Figura 12. Variación en la amplitud de la corriente de salida evocada por CaCCs en función del potencial de membrana. El potencial de membrana se fijó en -100 mV y fue desplazado mediante pulsos con un incremento de +20 mV hasta un potencial de +60 mV. Se comienza a observar una corriente de salida cuando el V_m sobrepasa los -10 mV, alcanzando un máximo de amplitud a los +20 mV, potencial al cual se produce la máxima entrada de Ca^{+2} y activación por tanto de CaCCs.

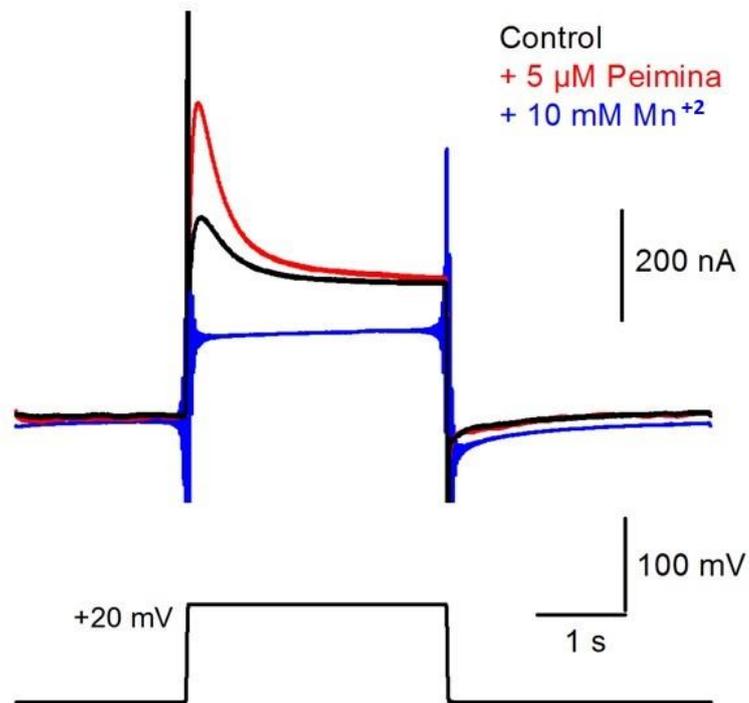


Figura 13. Potenciación de la I_{CaCC} ejercida por peimina. Se representa la corriente registrada en CaCCs (arriba), así como el protocolo de voltaje utilizado (abajo), en función del tiempo. El registro de color negro de la I_{CaCC} corresponde a un control representativo, obtenido por la aplicación de pulso de +20 mV en un medio RN con Ca^{+2} 10 mM, para llevar el V_m a +20 mV. Su aplicación junto con peimina 5 μM en el mismo ovocito se representa en color rojo. Cuando al medio extracelular se le elimina el Ca^{+2} y, además se le añade Mn^{+2} 10 mM, se impide la activación de los CaCCs con el pulso de voltaje, como se observa en el registro en azul, obtenido en la misma célula.

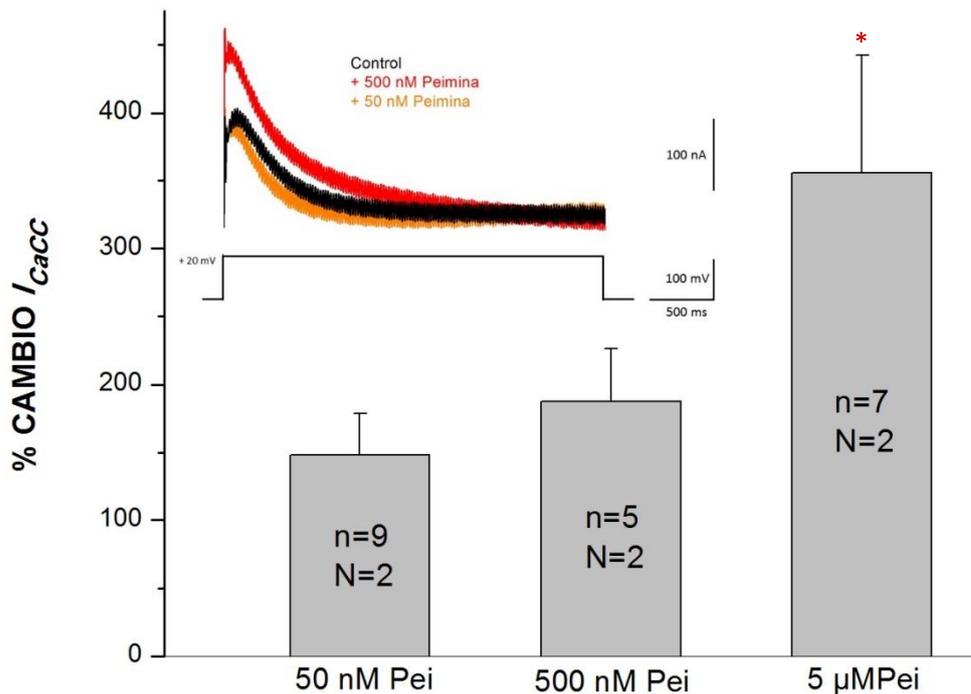


Figura 14. Potenciación de la I_{CaCC} ejercida por peimina a diferentes dosis. Se muestra un diagrama de barras que se corresponde con los valores medios obtenidos de porcentaje de cambio de la I_{CaCC} a peimina 5 μ M, 500 nM y 50 nM. El asterisco indica diferencias significativas con respecto a los valores obtenidos en ausencia de peimina ($p < 0,05$ en *t-test*). En el recuadro se muestra la I_{CaCC} evocada en el mismo ovocito por un pulso de voltaje a +20 mV en RNA (registro en negro), a peimina 50 nM (registro en naranja) y a peimina 500 nM (registro en rojo). Nótese la reducción del tiempo al pico de la I_{CaCC} bajo la influencia de la peimina.

4.3 EFECTO DE LA PEIMINA EN CIC-0

4.3.1 La peimina inhibe la I_{CIC-0}

La aplicación de rampas de voltaje hiperpolarizante-despolarizante (5 mV/sec), desde -20 a -120 y vuelta a -20 mV a ovocitos microinyectados con proteoliposomas provocó, por un lado, la apertura progresiva en los canales de cloruro CIC-0 de la compuerta lenta y el súbito cierre de la compuerta rápida durante el periodo hiperpolarizante y, por otro lado, la situación inversa durante el periodo despolarizante (ver Control Figura 15). La incubación del ovocito durante 2 minutos en peimina 5 μ M provocó la inhibición de la I_{CIC-0} en un $28,4 \pm 17,2$ % a -80 mV y un $46,3 \pm 8,1$ % a -120 mV ($n=6$; $N=4$) (Figura 16A, + 5 μ M peimina). Ambos valores resultaron significativos respecto del control en ausencia de peimina, así como entre ellos ($p < 0,05$ en *t-test* *pareado*) (Figura 16B).

El periodo de incubación fue establecido bajo el mismo criterio que en el estudio de CaCCs.

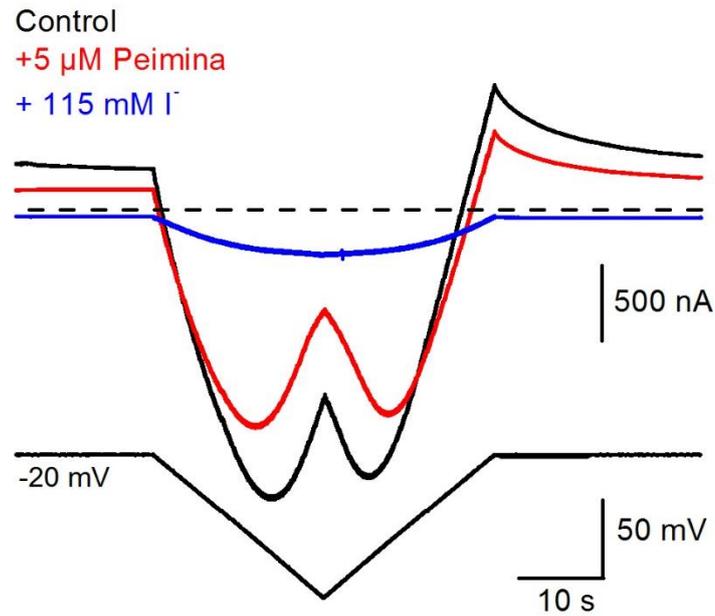
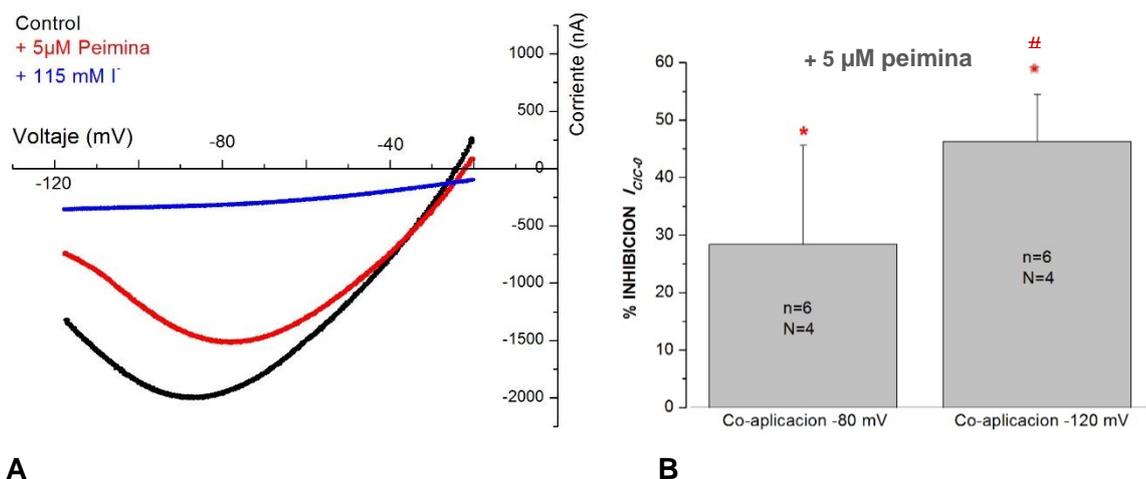


Figura 15. Inhibición de la $I_{\text{CIC-0}}$ ejercida por peimina. Se representa la corriente registrada en el canal CIC-0 (arriba), así como el protocolo de voltaje utilizado (abajo), en función del tiempo. El registro de color negro de la $I_{\text{CIC-0}}$ corresponde a un control representativo, obtenido por la aplicación de una rampa de voltaje hiperpolarizante-despolarizante en un medio RNA. La respuesta en presencia de peimina 5 μM en el mismo ovocito se representa en color rojo. Los canales CIC-0 se bloquearon cuando el Cl^- del medio fue sustituido por I^- (registro en azul. El trazo recto y discontinuo es la línea base, marcando el valor 0 de corriente iónica. Nótese cómo la corriente de partida es inferior en peimina respecto del control, denotando un bloqueo previo a la aplicación de la rampa de voltaje.



A

B

Figura 16. Inhibición voltaje-dependiente de la I_{CIC-0} ejercida por peimina. (A) Se representa la corriente registrada en el canal CIC-0 en función del voltaje al que se encuentra sometido durante la rampa hiperpolarizante-despolarizante. El registro de color negro la I_{CIC-0} corresponde a un control representativo, obtenido por la aplicación de una rampa de voltaje hiperpolarizante-despolarizante en un medio RNA solo. La aplicación, en el mismo ovocito, de la rampa de voltaje en presencia de peimina 5 μ M se representa en rojo. El bloqueo de los canales CIC-0 cuando se sustituye el Cl^- por I^- se representa en azul. **(B)** Se muestra un diagrama de barras que se corresponde con los valores medios obtenidos de porcentaje de inhibición de la I_{CIC-0} a -80 mV y -120 mV. El asterisco indica que la peimina inhibe significativamente la I_{CIC-0} ($p < 0,05$ en t -test de muestra única frente a un valor de 0) y la almohadilla que el porcentaje de inhibición de la I_{CIC-0} a -120 mV es mayor que a -80 mV ($p < 0,05$ en t -test pareado).

5.- DISCUSIÓN

El presente trabajo se enmarca en una de las líneas de investigación del tutor de este trabajo, acerca del efecto ejercido por la peimina sobre canales iónicos de interés terapéutico, ampliando el conocimiento en lo que respecta al abanico de interacciones de dicho modulador sobre otros canales, además del que ya se había observado sobre el nAChR.

La peimina, compuesto bioactivo predominante de los bulbos de *Frillitaria*, es un glucoalcaloide de solubilidad moderada debido a su conformación en anillos aromáticos combinados con varios grupos alcohol (Figura 4). Presenta un valor de pK_a de 9,5 por lo que la eminente mayoría de las especies de peimina presentes en una disolución a $pH=7$ (como es el Ringer Normal que superfundieron los ovocitos) están cargadas positivamente. Este hecho justifica que la permeabilidad del compuesto a través de la membrana plasmática sea muy baja y que sus mecanismos de acción sobre los canales iónicos se ejerzan, presumiblemente, a través de la vía hidrofílica; actuando a nivel del poro iónico cuando éste se encuentra en estado abierto o uniéndose a residuos localizados en dominios extracelulares del propio canal.

La peimina es comúnmente utilizada en la medicina tradicional china para aliviar síntomas gripales, entre los cuales se destaca como antitusivo, antiinflamatorio y analgésico. El desconocimiento, por otra parte, de los mecanismos por los que ejerce estas funciones la convierte en objeto de estudio de esta investigación.

5.1 ACTUACIÓN SOBRE nAChR

El carácter analgésico de la peimina puede ser explicado por su actuación moduladora de canales iónicos, que podrían ser activados por voltaje o ligandos. Uno de los efectos más evidentes de la peimina es la inhibición de los nAChRs. Hay una gran variedad de moduladores que presentan un efecto semejante en los nAChRs, entre lo que se destaca por su uso analgésico la lidocaína (Alberola-Die *et al.*, 2011), QX-314 (Koblin and Lester, 1979) y QX-222 (Pascual and Karlin, 1998). La inhibición que ejercen del nAChR se sitúa dentro del rango micromolar, con unos valores de CE_{50} en torno a 50 μM . La peimina, por su parte, se ha podido demostrar en este estudio como alcanza porcentajes de inhibición de la I_{ACh} superiores al 60% a una concentración de tan solo 5 μM (Figura 9B). Concretamente, las curvas dosis-inhibición realizadas anteriormente por Alberola-Die *et al.* (2019b) revelan un CE_{50} de 3 μM y un coeficiente de Hill de 1, lo que indica que una sola molécula de peimina es suficiente para bloquear el nAChR.

Respecto al modo de acción por el cual la peimina está reduciendo la amplitud y el tiempo al pico de la I_{ACh} y acelerando la cinética de caída de la corriente, se sugiere que esta molécula puede favorecer o estabilizar el estado desensibilizado del canal, por el cual éste adopta una conformación en la que tiene mayor afinidad por ACh, pero sin permitir el flujo iónico a través del canal. Por un lado, en este trabajo se ha podido observar que la exposición a peimina 5 μ M propicia que la I_{ACh} alcance antes el tiempo al pico (Figura 10), tal y como se había presenciado anteriormente en los estudios realizados por el grupo que desarrolla en esta línea de investigación (Arberola-Die *et al.*, 2019). Otros bloqueantes de nAChR, como la lidocaína y la tetracaína, también disminuyen el tiempo en el cual se alcanza la mayor amplitud de la I_{ACh} , hecho que se correlaciona con el bloqueo a canal abierto o el aumento de su desensibilización (Alberola-Die *et al.*, 2011; Cobo *et al.*, 2018). Por otro lado, los valores de porcentaje de inhibición obtenidos en pico y en meseta, siendo mayores en ésta última (Figura 9B), denotan una alteración en la cinética de desensibilización de la I_{ACh} . Este hecho se ve respaldado por las constantes de tiempo Tau más rápidas obtenidas en presencia de peimina (Figura 11), del mismo modo que se ha podido observar con la tetracaína (Cobo *et al.*, 2018).

A pesar de que estos resultados pueden reflejar un incremento en la desensibilización del nAChR, debemos ser cautos en la afirmación, puesto que para confirmarlo es necesario llevar a cabo experimentos adicionales que nos permitan descartar que la peimina inhibe el nAChR mediante un mecanismo de bloqueo por unión lenta, que también modificaría la cinética de inactivación de la I_{ACh} (Alberola-Die *et al.*, 2011; Alberola-Die *et al.*, 2016; Cobo *et al.*, 2018).

5.1 ACTUACIÓN SOBRE CaCC

Los CaCCs se encuentran ampliamente expresados en las células de los mamíferos, involucrándose en variedad de funciones fisiológicas que abarcan la secreción epitelial, excitabilidad del músculo cardíaco y de neuronas, transducción olfativa, regulación del tono vascular y modulación de la respuesta a la luz por los receptores (Hartzell, Putzier and Arreola, 2005). Con el paso del tiempo se han ido encontrando varios moduladores de CaCCs, en su mayoría con acción inhibitoria tales como el ácido tánico (Namkung *et al.*, 2010), CaCCinh-A01, TMEM16Ainh-A01 (Namkung *et al.*, 2011), ácido digálico, diclorofeno, benzbromarona, ácido N-[(4-metoxi)-2-naftil]-5-nitroantranílico (MONNA) (Oh *et al.*, 2013), e idebenona (Seo *et al.*, 2015). Entre los escasos activadores que se han encontrado se destaca la ginsenosida Rb1 (Guo *et al.*, 2017), el resveratrol (Chai *et al.*, 2017) y cinamaldehido

(Huang et al., 2018); todos ellos compuestos orgánicos propios de la medicina tradicional china al igual que la peimina.

Las concentraciones necesarias de estos moduladores para producir un cambio en la mitad de la I_{CaCC} (CE_{50}) son, en general, considerablemente grandes situándose la ginsenosida Rb1 en $38,4 \pm 2,14 \mu\text{M}$ y el resveratrol en $47,92 \pm 9,35 \mu\text{M}$. El cinamaldehido, por el contrario, presenta un valor bastante inferior con una CE_{50} de $9,73 \pm 5,64 \mu\text{M}$. A este respecto, la peimina se postula como un prometedor modulador, alcanzando potenciaciones superiores al 300% a tan solo $5 \mu\text{M}$ (Figura 14). El análisis estadístico realizado a dosis inferiores no pudo garantizar diferencias significativas respecto de la corriente registrada en ausencia de peimina, lo que hubiera permitido aproximar con certeza la CE_{50} de la peimina. Sin embargo, la causa de esta ausencia de diferencias posiblemente resida en el bajo número de casos registrados (5 a 500 nM y 9 a 500 nM), así como en sus grandes desviaciones lo que, en conjunto, no permite categorizar diferencias significativas respecto del control. Se puede observar, pese a todo, una tendencia clara de la peimina a potenciar la I_{CaCC} de una manera dosis-dependiente, situándose presumiblemente la CE_{50} entre 50 y 500 nM teniendo en cuenta sus porcentajes de cambio ($147,9 \pm 30,9 \%$ y $187,2 \pm 39,1 \%$ respectivamente). Es, en definitiva, una concentración extraordinariamente inferior a la que se puede encontrar en la bibliografía existente, y por tanto de sumo interés para la investigación de estos canales. Se plantea para experimentos futuros profundizar en el estudio del efecto de la peimina a diferentes dosis en el rango nanomolar con objeto de la determinación precisa de su CE_{50} .

Respecto a su posible modo de actuación, los activadores de CaCCs actúan por medio de dos vías principales: bien de manera directa sobre el CaCC (como la ginsenosida Rb1 y el resveratrol) o bien de manera indirecta aumentando la concentración intracelular de Ca^{2+} (como el cinamaldehido). En los últimos años se han ido desarrollando fármacos contra la fibrosis quística que actúan a través de esta segunda vía y que se encuentran a día de hoy en fase de ensayo clínico, como la duramicina (Grasemann *et al.*, 2007). Los moduladores, sin embargo, que actúan vía directa sobre los CaCCs se piensa que pueden llegar a ser más eficaces. En este sentido, conviene plantearse realizar un ensayo del efecto de la peimina sobre los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de la membrana del ovocito, que son los responsables de permitir la activación de la I_{CaCC} .

5.2 ACTUACIÓN SOBRE CIC-0

Los canales de cloruro CIC pueden encontrarse tanto en el dominio procariota como eucariota, participando en diversos procesos fisiológicos incluidos el transporte

transepitelial, excitabilidad de membrana, regulación del volumen celular y acidosis de orgánulos (Borsani *et al.*, 1995; Duan *et al.*, 1997; Estévez *et al.*, 2001; Koch *et al.*, 1992). A pesar de su relevancia en la investigación biomédica, existe una falta de inhibidores potentes de la actividad de CIC, situándose la mayoría en el rango de actuación milimolar como es el caso de los ácidos DIDS, 9AC y CPP (Furukawa *et al.*, 1998). Recientemente se han venido desarrollando derivados sintéticos de estos moduladores con una selectividad y potencia de actuación mejorada, habiéndose alcanzado en ciertos derivados de CPP una actividad bloqueante con una CE_{50} de 10 μM (Liantonio *et al.*, 2008). En esta línea, la peimina se postula como un prometedora bloqueante natural de los CIC-0. Debido al corto periodo de tiempo para realizar los experimentos, no se pudieron obtener registros de I_{CIC-0} a concentraciones de peimina superiores a 5 μM , lo que habría posibilitado el cálculo de la CE_{50} . Sin embargo, a partir de los registros obtenidos podemos deducir que este valor será próximo a 5 μM , ya que se han observado porcentajes de inhibición cercanos al 50% a esta concentración (Figura 16). Cabe señalar que la inhibición ejercida por la peimina resulta ser voltaje dependiente, de acuerdo con las diferencias significativas halladas en el porcentaje de inhibición a -80 mV y -120 mV (Figura 16B). Dicha actividad resulta de mayor grado a potenciales más negativos, hecho también observado en otros moduladores de este canal como los constituidos en el veneno del escorpión amarillo (Thompson *et al.*, 2005). Dado que la peimina es una molécula con carga neta positiva y con un tamaño relativamente grande, en comparación con la luz de un canal iónico, se puede especular que la hiperpolarización de la membrana forzaría a esta molécula a taponar la luz del canal, causando lo que se conoce como bloqueo de canal abierto. A la luz de estos resultados sería de interés la aplicación de protocolos de voltaje específicos con objeto de discernir si la peimina está actuando por medio de la alteración en el mecanismo de cierre de la compuerta lenta, rápida o ambas; tal y como Chen (2019) ha realizado recientemente en sus investigaciones de la modulación de CIC.

Por otro lado, resulta fundamental para la investigación molecular conocer la disposición espacial de los elementos del compuesto en cuestión para inferir sus posibles interacciones con el medio. Más interesante es el hecho de que se haya relacionado la estructura de ciertos moduladores de CIC, con idéntica composición química, con su efecto directo actuando o inhibiendo. Concretamente, la conformación coplanar de los anillos aromáticos se asocia con activadores de CIC, mientras que su disposición en diferentes planos resulta propia de bloqueantes (Liantonio *et al.*, 2008). A este respecto, conviene plantearse la visualización de la estructura tridimensional de la peimina para avalar este conocimiento de los bloqueantes de CIC.

6.- CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten concluir que:

1. Se han alcanzado los objetivos de aprendizaje metodológicos necesarios para realizar registros electrofisiológicos en ovocitos de *Xenopus*.
2. La co-aplicación de ACh (100 μM) con peimina (5 μM), inhibe de forma significativa la I_{ACh} . Además, la peimina acelera la fase de caída de la I_{ACh} en presencia sostenida del agonista, sugiriendo una potenciación de la desensibilización del nAChR.
3. La peimina, a una concentración de 5 μM , potencia de forma significativa la I_{CaCC} . Esta potenciación se observó en algunas células a concentraciones submicromolares. Queda pendiente conocer si es un efecto directo sobre los CaCCs o indirecto a través de la modulación de los canales de Ca^{+2} de la membrana del ovocito.
4. En el rango micromolar (5 μM), la peimina inhibe de forma significativa la I_{ClC-0} . Este efecto fue voltaje-dependiente, aumentando significativamente el bloqueo al hiperpolarizar la membrana, posiblemente por un mecanismo de bloqueo de canal abierto.

CONCLUSIONS

The results we have achieved can allow us to conclude that:

1. The methodological learning objectives necessary to perform electrophysiological recordings in *Xenopus* oocytes have been achieved.
2. Co-application of ACh (100 μM) with peimine (5 μM) significantly inhibits the I_{ACh} . In addition, peimine accelerates the fall phase of the I_{ACh} in the sustained presence of the agonist, suggesting an enhancement of the nAChR desensitization.
3. Peimine, at a concentration of 5 μM , significantly enhances I_{CaCC} . This potentiation was observed in some cells at submicromolar concentrations. It remains to be known if it is a direct effect on the CaCCs or indirectly through the modulation of the Ca^{+2} channels of the oocyte membrane.
4. In the micromolar range (5 μM), peimine significantly inhibits I_{ClC-0} . This effect was voltage-dependent, significantly increasing the blockage by hyperpolarizing the membrane, probably by an open-channel blocking mechanism.

8.- AGRADECIMIENTOS

No es posible eludir este apartado de formar parte del documento final cuando tanta bondad me ha acompañado a lo largo de esta investigación en particular, y mi experiencia universitaria en general. Más allá de obviarse, ha de valorarse.

Gracias, en primer lugar, al Dr. Andrés Morales porque sin él este trabajo no habría sido posible. Por todas las horas brindadas, ya sea de manera escrita o en persona, desde el comienzo en la asignatura de Fisiología Animal I hasta este TFG. Por su entusiasmo desbordante por la ciencia, que envidiaría cualquier espíritu juvenil. Por ser un referente, ahora y para siempre, de liderazgo desde la cercanía, prudencia y sabiduría que le otorga su experiencia.

Gracias, al ya pronto Dr. Raúl Cobo porque sin él mi manejo de los equipos en el laboratorio no hubiera sido posible. Por ser el becario que le toca ayudar al nuevo, y hacerlo siempre con mucha paciencia, tesón e ilusión. Por las risas cuando la ofuscación se me apoderaba. Por ser el mejor profesor de Fisiología que tendrá la universidad, o el único de Tomelloso al menos.

Gracias, al resto del equipo: el Dr. Armando Arberola-Die, por estar siempre dispuesto a ayudar; la Dra. Isabel Ivorra, por ser el rostro más cándido del departamento; y el técnico Simón, por ser la base de esta pirámide que es el Departamento.

Gracias, por otro lado, a mis seres queridos, por apostar siempre por mí y ser la razón de que la vida es, más allá de lo que logres, los enlaces que forjes.

Y gracias, a mi madre, porque estaría orgullosa.

9.- BIBLIOGRAFÍA

- Alberola-Die, A., Cobo, R., Ivorra, I., and Morales, A. (2019a). Pharmacology of muscle-type nicotinic receptors. En: *Neuroscience of nicotine. Mechanisms and treatment*. Preedy, V.R., eds. Elsevier, pp. 267-276.
- Alberola-Die, A., Cobo, R., Velasco, A., Nikolaeva, M., Encinar, J.A., González-Ros, J.M., Ivorra, I., and Morales, A. (2019b). Inhibition of muscle-type nicotinic acetylcholine receptors by the alkaloid peimine, *7ª Red Española de Canales Iónicos*. Cáceres, 15-17 mayo 2019.
- Alberola-Die, A., Fernández-Ballester, G., González-Ros, J.M., Ivorra, I., and Morales, A. (2016). Muscle-type nicotinic receptor modulation by 2,6-dimethylaniline, a molecule resembling the hydrophobic moiety of lidocaine. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9, pp. 127.
- Alberola-Die, A., Martínez-Pinna, J., González-Ros, J.M., Ivorra, I., and Morales, A. (2011) Multiple inhibitory actions of lidocaine on Torpedo nicotinic acetylcholine receptors transplanted to *Xenopus* oocytes. *Journal of Neurochemistry*, 117(6), pp.1009–1019.
- Albuquerque, E.X., Pereira, E.F., Alkondon, M., and Rogers, S.W. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiological Reviews*, 89(1), pp. 73-120.
- Barish, M.E. (1983). A transient calcium-dependent chloride current in the immature *Xenopus* oocyte. *Journal of Physiology*, 342(1), pp. 309-325.
- Borsani, G., Rugarli, E.I., Tagliatela, M., Wong, C., and Ballabio, A. (1995). Characterization of a human and murine gene (CLCN3) sharing similarities to voltage-gated chloride channels and to a yeast integral membrane protein. *Genomics*, 27(1), pp. 131-141.
- Bouzat, C., and Sine, S.M. (2018). Nicotinic acetylcholine receptors at the single-channel level. *British Journal of Pharmacology*, 175(11), pp. 1789-1804.
- Camerino, D.C., Tricarico, D., and Desaphy, J.F. (2007). Ion channel pharmacology. *Neurotherapeutics*, 4(2), pp. 184-198.
- Catterall, W.A. (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(8), p. a003947.
- Chai, R., Chen, Y., Yuan, H., Wang, X., Guo, S., Qi, J., and An, H. (2017). Identification of resveratrol, an herbal compound, as an activator of the calcium-activated chloride channel, TMEM16A. *Journal of Membrane Biology*, 250(5), pp. 483-492.

- Changeux, J.P. (2012). The nicotinic acetylcholine receptor: the founding father of the pentameric ligand-gated ion channel superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 287(48), pp. 40207-40215.
- Chen, H.Y., and Chen, X.Y. (2012). Effect of peimine on inhibiting the MCF-7/TAM proliferation of human breast cancer cell and its influence on cell apoptosis. *Zhong Xue*, 40, pp. 12-15.
- Chen, M.H., Wang, H.C., and Zhu, Y.M. (2007). Pharmacological research on *Fritillaria*. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 13(1), pp. 103-105.
- Chemicalize (2019) Calculation. Disponible en: <https://chemicalize.com/> [Consultado 28-3-2019].
- Chou, T.Q., and Chen, K.K. (1932). The alkaloids of the Chinese drug pei-mu, *Fritillaria roylei*. I. Peimine and peiminine. *Chin J. Physiol.*, 6, pp. 265-270
- Cobo, R., Nikolaeva, M., Alberola-Die, A., Fernández-Ballester, G., González-Ros, J.M., Ivorra, I., and Morales, A. (2018). Mechanisms underlying the strong inhibition of muscle-type nicotinic receptors by tetracaine. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11.
- Coste, B., Xiao, B., Santos, J.S., Syeda, R., Grandl, J., Spencer, K.S., and Montal, M. (2012). Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels. *Nature*, 483(7388), pp. 176.
- Da-Cheng, H.A.O., Xiao-Jie, G., Pei-Gen, X.I.A.O., and Yong, P.E.N.G. (2013). Phytochemical and biological research of *Fritillaria* medicine resources. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 11(4), pp. 330-344.
- Duan, D., Winter, C., Cowley, S., Hume, J.R., and Horowitz, B. (1997). Molecular identification of a volume-regulated chloride channel. *Nature*, 390(6658), p. 417.
- Dumont, J.N. (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *Journal Morphology*, 136, pp. 153-79.
- Dutzler, R., Campbell, E.B., Cadene, M., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (2002). X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature*, 415(6869), pp. 287.
- Estévez, R., and Jentsch, T. (2002). CLC chloride channels: correlating structure with function. *Current Opinion in Structural Biology*, 12(4), pp. 531-539.
- Estévez, R., Boettger, T., Stein, V., Birkenhäger, R., Otto, E., Hildebrandt, F., and Jentsch, T.J. (2001). Barttin is a Cl-channel β -subunit crucial for renal Cl-reabsorption and inner ear K⁺ secretion. *Nature*, 414(6863), p. 558.

- Ferrera, L., Caputo, A., and Galletta, L.J. (2010). TMEM16A protein: a new identity for Ca²⁺-dependent Cl⁻ channels. *Physiology*, 25(6), pp. 357-363.
- Flores Soto, M.E., y Segura Torres, J.E. (2005). Estructura y función de los receptores acetilcolina de tipo muscarínico y nicotínico. *Rev. Mex .Neuroci.*, 6(4), pp. 315-326.
- Furukawa, T., Ogura, T., Katayama, Y., and Hiraoka, M. (1998). Characteristics of rabbit ClC-2 current expressed in *Xenopus* oocytes and its contribution to volume regulation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 274(2), pp. 500-512.
- Galindo, B.E., and Vacquier, V.D. (2005). Phylogeny of the TMEM16 protein family: some members are overexpressed in cancer. *International Journal of Molecular Medicine*, 16(5), pp. 919-924.
- Grasemann, H., Stehling, F., Brunar, H., Widmann, R., Laliberte, T. W., Molina, L., and Ratjen, F. (2007). Inhalation of Moli1901 in patients with cystic fibrosis. *Chest*, 131(5), pp. 1461-1466.
- Gu, Z.Y., Zhang, P., Nie, Y. Z., Wu, Q., Sun, Y. H., and Dou, W.J. (2012). Screening for five alkaloids as reversal agents against gastric cancer multiple drug resistance and study on their mechanism. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 43(6), pp. 1151-1156.
- Guo, S., Chen, Y., Pang, C., Wang, X., Qi, J., Mo, L., and Zhan, Y. (2017). Ginsenoside Rb1, a novel activator of the TMEM16A chloride channel, augments the contraction of guinea pig ileum. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 469(5-6), pp. 681-692.
- Hartzell, C., Putzier, I., and Arreola, J. (2005). Calcium-activated chloride channels. *Annu. Rev. Physiol.*, 67, pp. 719-758.
- Hodgkin, A.L., and Huxley, A.F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *Journal of Physiology*, 117(4), pp. 500-544.
- Huang, Y., Guo, S., Ren, S., Chen, Y., Zhan, Y., and An, H. (2018). The natural compound cinnamaldehyde is a novel activator of calcium-activated chloride channel. *Journal of Membrane Biology*, 251(5-6), pp. 747-756.
- Hurst, R., Rollema, H., and Bertrand, D. (2013). Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics*, 137(1), pp. 22-54.
- Ito, S., Kato, M., Shibata, K., and Nozoe, T. (1963). On the Alkaloid of *Fritillaria verticillata* var. *Thunbergii*. II. The Structure of Verticine. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 11(10), pp. 1337-1340.

- Ivorra, I., Fernández, A., Gal, B., Aleu, J., González-Ros, J.M., Ferragut, J.A., and Morales, A. (2002). Protein orientation affects the efficiency of functional protein transplanted into the *Xenopus* oocyte membrane. *Journal of Membrane Biology*, 185(2), pp. 117-127.
- Jentsch, T.J., Stein, V., Weinreich, F., and Zdebik, A.A. (2002). Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiological Reviews*, 82(2), pp. 503-568.
- Jentsch, T.J., Friedrich, T., Schriever, A., and Yamada, H. (1999). The CLC chloride channel family. *Pflügers Archiv*, 437(6), pp. 783-795.
- Jentsch, T.J., Steinmeyer, K., and Schwarz, G. (1990). Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Nature*, 348(6301), pp. 510.
- Kan, L., Zhao, W., Pan, L., Xu, J., Chen, Q., Xu, K., and Chen, Y. (2017). Peimine inhibits hERG potassium channels through the channel inactivation states. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 89, pp. 838-844.
- Kew, J.N., and Davies, C.H. (2010). Ion channels: from structure to function. USA: *Oxford University Press*.
- Koblin, D.D., and Lester, H.A. (1979) Voltage-dependent and voltage-independent blockade of acetylcholine receptors by local anesthetics in *Electrophorus* electroplaques. *Molecular pharmacology*, 15(3), pp.559–80.
- Koch, M.C., Steinmeyer, K., Lorenz, C., Ricker, K., Wolf, F., Otto, M., Otto, M., Zoll, B., Lehmann-Horn, F., Grzeschik, K.H., and Jentsch, T.J. (1992). The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science*, 257(5071), pp. 797-800.
- Kusano, K., Miledi, R., and Stinnakre, J. (1982). Cholinergic and catecholaminergic receptors in the *Xenopus* oocyte membrane. *Journal of Physiology*, 328(1), pp. 143-170.
- Law Pharmnet (2002) Circular of the ministry of health on further standardize the management of health food ingredients. Disponible en: <http://law.pharmnet.com.cn/> [Consultado 9-4-2019].
- Liantonio, A., Picollo, A., Carbonara, G., Fracchiolla, G., Tortorella, P., Loiodice, F., and Camerino, D.C. (2008). Molecular switch for CLC-K Cl⁻ channel block/activation: optimal pharmacophoric requirements towards high-affinity ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(4), pp. 1369-1373.
- Lloyd, S.E., Pearce, S.H., Fisher, S.E., Steinmeyer, K., Schwappach, B., Scheinman, S.J., Harding, B., Bolino, M., Devoto, M., Goodyer, P., Regden,

- S.P.A., Wrong, O., Jentsch, T.J., Craig, I.W., and Thakker R.V. (1996). A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature*, 379(6564), p. 445.
- Martinez-Carrion, M., González-Ros, J.M., Mattingly, J.R., Ferragut, J.A., Farach, M.C., and Donnelly, D. (1984). Fluorescence probes for the study of acetylcholine receptor function. *Biophysical Journal*, 45, pp. 141-3.
- Morales, A., Aleu, J., Ivorra, I., Ferragut, J.A., González-Ros, J.M., and Miledi, R. (1995). Incorporation of reconstituted acetylcholine receptors from Torpedo into the *Xenopus* oocyte membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 92, pp. 8468-72.
- Miledi, R. (1982). A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 215(1201), pp. 491-497.
- Miledi, R., Parker, I., and Sumikawa, K. (1989). Transplanting receptors from brains into oocytes. *Fidia Research Foundation Neuroscience Award Lectures*, 3, 57-90.
- Namkung, W., Yao, Z., Finkbeiner, W. E., and Verkman, A. S. (2011). Small-molecule activators of TMEM16A, a calcium-activated chloride channel, stimulate epithelial chloride secretion and intestinal contraction. *The FASEB Journal*, 25(11), pp. 4048-4062.
- Namkung, W., Thiagarajah, J.R., Phuan, P. W., and Verkman, A.S. (2010). Inhibition of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels by gallotannins as a possible molecular basis for health benefits of red wine and green tea. *The FASEB Journal*, 24(11), pp. 4178-4186.
- Ochoa, E.L., Chattopadhyay, A., and McNamee, M.G. (1989). Desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor: molecular mechanisms and effect of modulators. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 9(2), pp. 141-178.
- Oh, S.J., Hwang, S.J., Jung, J., Yu, K., Kim, J., Choi, J.Y., and Lee, C.J. (2013). MONNA, a potent and selective blocker for transmembrane protein with unknown function 16/anoctamin-1. *Molecular Pharmacology*, 84(5), pp. 726-735.
- Pascual, J.M., and Karlin, A. (1998) Delimiting the binding site for quaternary ammonium lidocaine derivatives in the acetylcholine receptor channel. *Journal of General Physiology*, 112(5), pp.611–621.
- Patiño, N.M. (2008). *Farmacología médica/Medical Pharmacology*. Madrid: Médica Panamericana.

- Qi, Y., Liao, B., and Xu, C.B. (2017) Effects of peimine on cell viability and apoptosis of multidrug resistant human leukemia cells. *Shandong Medical Journal*, 57(26), pp. 17–20.
- Raghavendra T. (2002). Neuromuscular blocking drugs: discovery and development. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 95(7), pp. 363–367.
- Ruetsch, Y.A., Boni, T., and Borgeat, A. (2001). From cocaine to ropivacaine: the history of local anesthetic drugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1(3), pp. 175-182.
- Santos, S.E. (2003). Paracelso el médico, Paracelso el alquimista. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, 4, pp. 53-61.
- Simón, D.B., Bindra, R.S., Mansfield, T.A., Nelson-Williams, C., Mendonca, E., Stone, R., Schurman, S., Nayir, A., Alpay, H., Bakkaloglu, A., Rodriguez-Soriano, J., Morales, J.M., Sanjad, S.A., Taylor, C.M., Pilz, D., Brem, A., Trachtman, H., Griswold, W., Richard, G.A., John, E., and Lifton, R.P. (1997). Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. *Nature Genetics*, 17(2), pp. 171.
- Taleisnik, S. (2006). *Receptores celulares y la transducción de señales. Temas de Biología Celular*. Argentina: Brujas.
- Taly, A., Corringer, P.J., Guedin, D., Lestage, P., and Changeux, J.P. (2009). Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(9), pp. 733.
- Tang, W., and Eisenbrand, G. (2013). Chinese drugs of plant origin: chemistry, pharmacology, and use in traditional and modern medicine. *Springer Science & Business Media*.
- Tang, X.Y., and Tang, Y.X. (2012). Efficiency and mechanisms of peimine reversing multi-drug resistance of A549/DDP cell line. *Shandong Medical Journal*, 52(18), pp. 4-6.
- Tang, X.Y., Tang, Y.X., Xu, P., Zhou, H. Y., and Han, L. (2015). Effect of peimine on ERCC1 mRNA and LRP expressions of A549/DDP multidrug resistance cell line. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, 35(12), pp. 1490-1494.
- Thiagarajah, J.R., Donowitz, M., and Verkman, A.S. (2015). Secretory diarrhoea: mechanisms and emerging therapies. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 12(8), pp. 446.
- Thompson, C.H., Fields, D.M., Olivetti, P.R., Fuller, M.D., Zhang, Z.R., Kubanek, J., and McCarty, N.A. (2005). Inhibition of CIC-2 chloride channels by a peptide

component or components of scorpion venom. *Journal of Membrane Biology*, 208(1), pp. 65-76.

Verkman, A.S., and Galiotta, L.J. (2009). Chloride channels as drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(2), p. 153.

Wang, B., Li, C., Huai, R., and Qu, Z. (2015). Overexpression of ANO1/TMEM16A, an arterial Ca²⁺-activated Cl⁻ channel, contributes to spontaneous hypertension. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 82, pp. 22-32.

Xu, J., Zhao, W., Pan, L., Zhang, A., Chen, Q., Xu, K., and Chen, Y. (2016). Peimine, a main active ingredient of Fritillaria, exhibits anti-inflammatory and pain suppression properties at the cellular level. *Fitoterapia*, 111, pp. 1-6.

Xu, F.Z., Chen, C., Zhou, X.Q., Wang, L.J., and He, G.M. (2008). Study on the Analgic Effect and the Physical Dependence of Verticinone. *Pharmacy Today*, 6.

Yin, Z., Zhang, J., Guo, Q., Chen, L., Zhang, W., and Kang, W. (2019). Pharmacological Effects of Verticine: Current Status. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.