



Efecto de toxinas provenientes de *P. verdolaga* sobre corrientes de Ca^{2+} y K^+ en células excitables de un modelo murino



ALEJANDRO GÓMEZ RESTREPO
Grupo PHYSIS, Universidad de Antioquia

MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
ÉNFASIS FISIOLOGÍA, FARMACOLOGÍA Y BIOQUÍMICA

TUTOR

Juan Camilo Calderón. PhD

Departamento de Fisiología y Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia

Coordinador Grupo PHYSIS, Universidad de Antioquia

COTUTOR

Marco Antonio Giraldo. PhD

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia

Coordinador Grupo de Biofísica, Universidad de Antioquia

COMITÉ TUTORIAL

José Alexander Álvarez Bustamante. PhD

Marcela María Manrique Moreno. PhD

César Hernando Segura Latorre. PhD

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
CORPORACIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
MEDELLÍN

2022

Notas de aceptación

Jurado

Jurado

Agradecimientos

A mi tutor Juan Camilo Calderón por su paciencia y rigurosidad, por ser una fuente de inspiración inagotable y por enseñarme que en nuestro país se puede hacer ciencia de calidad, comparable a cualquier parte del mundo.

A mi cotutor Marco Giraldo por ser un ejemplo de superación y motivación cuando creíamos que no iba ser posible alcanzar nuestros objetivos.

A Jéssica Rojas por las risas, las lágrimas, el apoyo incondicional durante estos años y por su increíble creatividad que jamás deja de sorprenderme. Sin Jéssica y su enorme resiliencia este proyecto no hubiera podido llevarse a cabo.

A Andrés Milán por su valiosa formación y apoyo en el trabajo experimental.

A mis padres Luz María y Luis Fernando por apoyarme y motivarme en cada uno de mis sueños, por enseñarme que todo es posible cuando te lo propones, que siempre hay que soñar en grande y que la vida “es un ratico y nacimos para ser felices”.

A Daniel, Maritza, Diana y Miguel por escucharme y acompañarme en los momentos de aislamiento.

Al profesor Jean Paul Delgado por facilitarnos amablemente su micromanipulador, y a los miembros del Comité tutorial por sus interesantes aportes.

A la Corporación de Ciencias Básicas Biomédicas (CCBB) por cumplir una función fundamental en el desarrollo de la ciencia en el país y por apoyar a muchos estudiantes a cumplir su sueño de ser investigadores.

Contenido

| | |
|---|----|
| AGRADECIMIENTOS..... | 2 |
| LISTA DE FIGURAS..... | 6 |
| LISTA DE ABREVIATURAS | 8 |
| RESUMEN..... | 9 |
| ABSTRACT | 12 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 15 |
| 2. MARCO TEÓRICO..... | 20 |
| 2.1 Potencial de membrana y potencial de acción en células excitables | 20 |
| 2.2 Canales iónicos | 23 |
| 2.3 Canales iónicos dependientes de voltaje..... | 24 |
| 2.4 Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_v)..... | 24 |
| 2.4.1 Activación, desactivación e inactivación de Ca_v | 26 |
| 2.4.2 Isoformas de Ca_v | 27 |
| 2.5 Canales de K^+ dependientes de voltaje (K_v)..... | 28 |
| 2.5.1 Activación, desactivación e inactivación del canal de K_v | 29 |
| 2.5.2 Isoformas de K_v | 30 |
| 2.5.3 Corrientes iónicas de K^+ (I_K) en el corazón..... | 30 |
| 2.6 La técnica de <i>patch-clamp</i> | 33 |
| 2.6.1 Descripción de la técnica y configuraciones de registro | 36 |
| 2.6.2 Aislamiento de corrientes iónicas | 39 |
| 2.7. Modelos celulares | 40 |
| 2.7.1 Cardiomiocitos | 40 |
| 2.7.2 Neuronas del ganglio espinal (DRG) | 42 |
| 2.8 ¿Qué son las toxinas?..... | 45 |
| 2.8.1 Toxinas y canales iónicos | 46 |
| 2.8.2 Toxinas provenientes de arañas | 47 |
| 2.8.3 Péptidos aislados de arañas con efecto sobre Ca_v | 48 |
| 2.8.4 Péptidos aislados de arañas con efecto sobre K_v | 49 |
| 2.8.5 Otras aplicaciones de toxinas de arañas | 49 |
| 2.8.6 Péptidos con puentes disulfuro | 50 |

| | |
|---|----|
| 2.8.7 <i>Pamphobeteus verdolaga</i> | 51 |
| 3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN..... | 52 |
| 4. HIPÓTESIS | 52 |
| 5. OBJETIVOS..... | 52 |
| 5.1 General | 52 |
| 5.2 Específicos | 53 |
| 6. METODOLOGÍA | 53 |
| 6.1 Animales y aspectos éticos | 53 |
| 6.2 Diseño experimental | 54 |
| 6.3 Soluciones y reactivos | 56 |
| 6.3.1 Aislamiento de cardiomiocitos y neuronas..... | 56 |
| 6.3.2 Medición de I_{CaL} | 56 |
| 6.3.3 Medición de I_K | 56 |
| 6.3.4 Enzimas y fármacos..... | 56 |
| 6.3.5 Inmunofluorescencia en DRG..... | 56 |
| 6.3.6 Experimentos de viabilidad neuronal | 57 |
| 6.4 Procedimientos experimentales..... | 57 |
| 6.4.1 Aislamiento de cardiomiocitos..... | 57 |
| 6.4.2 Aislamiento de neuronas..... | 61 |
| 6.4.3 Preparación de micropipetas | 65 |
| 6.4.4 <i>Patch-clamp</i> | 66 |
| 6.5 Análisis estadístico..... | 71 |
| 7. RESULTADOS | 72 |
| 7.1 Aislamiento exitoso de cardiomiocitos y neuronas del DRG..... | 72 |
| 7.1.1 Cardiomiocitos | 72 |
| 7.1.2 Neuronas del DRG..... | 72 |
| 7.2 Registro satisfactorio de I_{CaL} e I_K en cardiomiocitos de ratón | 75 |
| 7.3 Péptidos derivados del transcriptoma de la glándula venenosa de <i>P. verdolaga</i> modulan I_{CaL} e I_K | 78 |
| 7.3.1 Efecto de péptidos provenientes de <i>P. verdolaga</i> sobre I_{CaL} | 78 |
| 8. DISCUSIÓN | 85 |

| | |
|---|------------|
| 8.1 Modelos experimentales y calidad de los registros | 85 |
| 8.2 Nuevas toxinas bloqueadoras de canales iónicos | 88 |
| 9. FORTALEZAS Y DEBILIDADES | 92 |
| 10. PERSPECTIVAS | 93 |
| 11. FINANCIAMIENTO | 94 |
| 12. CONFLICTO DE INTERÉS | 94 |
| 13. GRADO DE ORIGINALIDAD | 95 |
| GRUPOS DE INVESTIGACIÓN QUE APOYAN ESTE TRABAJO DE GRADO | 95 |
| PHYSIS | 95 |
| BIBLIOGRAFÍA | 96 |
| ANEXOS | 107 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Potencial de acción cardíaco y corrientes iónicas involucradas..... | 22 |
| Figura 2. Estructura general de los Cav..... | 25 |
| Figura 3. Estructura general de los Kv..... | 28 |
| Figura 4. Configuraciones de registro y <i>setup</i> de la técnica de <i>patch-clamp</i> | 38 |
| Figura 5. Caracterización morfológica y electrofisiológica de un cardiomiocito murino.. | 41 |
| Figura 6. Caracterización morfológica y electrofisiológica de neuronas del ganglio espinal (DRG) de ratón..... | 43 |
| Figura 7. Resumen del diseño experimental. | 55 |
| Figura 8. Montaje experimental para el aislamiento de cardiomiocitos. | 59 |
| Figura 9. Aislamiento de neuronas del DRG. | 63 |
| Figura 10. Preparación de micropipetas..... | 66 |
| Figura 11. <i>Setup</i> de <i>patch-clamp</i> | 67 |
| Figura 12. Técnica de <i>patch-clamp</i> para la obtención de corrientes iónicas. | 69 |
| Figura 13. Resultado de aislamiento de cardiomiocitos con sistema de perfusión inversa Langendorff.. | 72 |
| Figura 14. Inmunomarcaje en neuronas del DRG..... | 73 |
| Figura 15. Experimentos de viabilidad celular en neuronas del DRG cargadas con Mag- Fluo-4. | 74 |
| Figura 16. Resistencia de micropipeta en el baño y capacitancia de membrana en cardiomiocitos de ratón. | 75 |
| Figura 17. I _{CaL} en cardiomiocitos de ratón. | 76 |
| Figura 18. I _K en cardiomiocitos de ratón..... | 77 |
| Figura 19. Efecto de péptidos vrdg sobre I _{CaL} en cardiomiocitos de ratón..... | 80 |
| Figura 20. Efecto de péptidos vrdg sobre I _K en cardiomiocitos de ratón. | 83 |
| Figura 21. Efecto de isoproterenol y vrdg183 sobre I _{CaL} | 85 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Fármacos derivados de venenos aprobados por la FDA para el tratamiento de enfermedades humanas..... | 16 |
| Tabla 2. Tipos de corrientes de C_{av} y su función. | 28 |
| Tabla 3. Principales isoformas involucradas en los tipos de corrientes de K^+ en el corazón | 31 |
| Tabla 4. Porcentaje de inhibición de péptidos vrdg sobre I_{CaL} e I_K en cardiomiocitos de ratón | 83 |

Lista de abreviaturas

ASIC: Canales iónicos sensibles a ácidos
Cav: Canal de Ca²⁺ dependiente de voltaje
DBP: Péptidos con puentes disulfuro
DRG: Ganglio de la raíz dorsal
FDA: *Food and drug administration*
I_{Ca}: Corriente iónica de Ca²⁺
I_{CaL}: Corriente de Ca²⁺ tipo L
I_K: Corriente iónica de K⁺
I_{K1}: Corriente iónica de K⁺ rectificadora retrasada
I_{Kur}: Corriente iónica de K⁺ rectificadora retrasada componente ultrarrápido
I_{Kr}: Corriente iónica de K⁺ rectificadora retrasada componente rápido
I_{Ks}: Corriente iónica de K⁺ rectificadora retrasada componente lento
I_{Na}: Corriente iónica de sodio
I-V: Corriente vs voltaje
I_{to}: Corriente iónica de K⁺ transitoria de salida
I_{tof}: Corriente iónica de K⁺ transitoria de salida componente rápido
I_{tos}: Corriente iónica de K⁺ transitoria de salida componente lento
K_v: Canal de K⁺ dependiente de voltaje
GLP1: Péptido similar a glucagón tipo 1
Na_v: Canal de Na⁺ dependiente de voltaje
NDBP: Péptido sin puentes disulfuro
PD: Dominio del poro
SF: Filtro de selectividad
TEA: Tetraetilamonio
TRP: Receptor de potencial transitorio
TTX: Tetrodotoxina
VGIC: Canal dependiente de voltaje
VSD: Dominio sensor del voltaje

Resumen

Introducción: Los venenos producidos por animales son mezclas complejas de proteínas, péptidos, carbohidratos y otras biomoléculas, que en conjunto alteran procesos fisiológicos y bioquímicos sobre el individuo inoculado. Las toxinas, usualmente péptidos de bajo peso molecular, son los componentes activos del veneno. Éstas han sido herramientas de investigación invaluable que han servido para explicar diversos procesos fisiológicos como la coagulación o las propiedades eléctricas de células excitables. Muchas toxinas provenientes de arañas son péptidos de menos de 10 kDa con puentes disulfuro (DBP, por sus siglas en inglés “*disulfide bridged peptides*”). Los DBP tienen alta resistencia a proteasas, pH ácido y altas temperaturas y gran afinidad por canales como: TRP (*transient receptor potential channel*), ASIC (*acid-sensing ionic channel*), receptores de glutamato, y canales iónicos dependientes de voltaje. Análisis bioinformáticos del transcriptoma de la glándula venenosa de la araña *Pamphobeteus verdolaga* han mostrado la presencia de DBP, para los cuales no se ha establecido su potencial efecto sobre corrientes iónicas de Ca^{2+} (I_{Ca}) y K^+ (I_K) en células excitables.

Objetivo general: Evaluar el efecto de DBP provenientes del transcriptoma de la glándula venenosa de la araña *P. verdolaga* sobre I_{Ca} e I_K en células excitables de un modelo murino. **Metodología:** Se estandarizó el aislamiento de cardiomiocitos y neuronas del ganglio espinal (DRG) por medio del sistema de perfusión inversa de Langendorff y métodos enzimáticos (colagenasa y proteasa), de ratones adultos, machos, de la cepa Swiss Webster. El aislamiento exitoso de los cardiomiocitos se comprobó mediante la determinación de las características morfológicas y la respuesta a estímulos eléctricos. La obtención de neuronas del DRG fue validada por medio de

inmunofluorescencia indirecta con los marcadores del citoesqueleto neuronal NF-200 y β -III-tubulina, la viabilidad celular fue comprobada usando el indicador fluorescente de Ca^{2+} Mag-Fluo-4. Las imágenes de campo claro y fluorescencia se adquirieron mediante una cámara acoplada a un microscopio invertido, equipado con los filtros adecuados. Se evaluó el efecto de 5 DBP y 1 péptido sin puentes disulfuro (NDBP) sobre I_{Ca} e I_{K} en cardiomiocitos mediante la técnica de *patch-clamp*, en configuración *whole cell*, a partir de sellos de alta resistencia ($>1 \times 10^9 \Omega$). Las pipetas se fabricaron puliendo capilares de borosilicato hasta obtener resistencias en el baño entre 1.6-2.6 $M\Omega$ y se utilizaron soluciones internas y externas específicas para aislar las corrientes de interés. Los péptidos fueron suministrados por un grupo colaborador. Para todos los experimentos se hicieron entre 3 y 6 réplicas independientes. **Resultados:** De cada corazón se obtuvieron abundantes cardiomiocitos intactos, con membrana brillante, forma alargada, extremos irregulares, estriaciones transversales, contracción ante el estímulo y presencia de corrientes iónicas. Las neuronas del DRG fueron positivas para los marcadores NF-200 y β -III-tubulina, y se cargaron con el indicador fluorescente Mag-Fluo-4, demostrando una intensidad y homogeneidad de fluorescencia esperables para células vivas. Se obtuvieron de manera exitosa corrientes iónicas de Ca^{2+} tipo L (I_{CaL}) e I_{K} , con cinéticas y curvas corriente-voltaje similares a las descritas en la literatura. Se logró evaluar el efecto de los 6 péptidos de interés sobre I_{CaL} e I_{K} en cardiomiocitos de ratón. Los péptidos vrdg69 y vrdg177 poseen un efecto inhibitorio mayor al 40% tanto sobre I_{CaL} como I_{K} , lo cual los hace péptidos poco selectivos. vrdg183 mostró un efecto inhibitorio mayor al 66% sobre I_{CaL} , pero despreciable sobre I_{K} . vrdg164 tuvo un efecto inhibitorio menor al 25% sobre I_{CaL} e I_{K} , pero retrasó el tiempo de activación de I_{CaL} . Esto puede indicar que

el péptido interacciona con el dominio sensor de voltaje. vrdg66, el único NDBP, inhibió 16% I_{CaL} y 24% I_K . **Discusión y conclusiones:** La caracterización de los modelos celulares basada en técnicas morfológicas, moleculares, y electrofisiológicas, así como la cinética de las corrientes obtenidas, permiten asegurar que los resultados son confiables. vrdg183 y vrdg164 muestran resultados promisorios por su efecto específico sobre I_{CaL} . Esto podría darles potencial uso como antihipertensivos, herramientas biotecnológicas o moduladores de canales para investigación. De otro lado, los péptidos que no mostraron efecto sobre canales exhibieron potencial actividad antimicrobiana. Nuestros resultados sugieren que pueden ser cardiosseguros, permitiéndoles continuar su desarrollo como potenciales medicamentos. El mecanismo más probable para explicar la inhibición de las corrientes es la interacción directa del péptido con el canal, algo que debe verificarse en futuros ensayos utilizando otras técnicas de estudio. Este trabajo de grado se convierte en el primero de un estudiante de la CCBB utilizando técnicas de electrofisiología celular dentro de la Universidad de Antioquia (UdeA). Se abre la puerta para futuros proyectos, publicaciones y colaboraciones entre Grupos de investigación en Ciencias Biomédicas. Proyecto 111577757673, Minciencias.

Abstract

Introduction: Animal venoms are complex mixtures of proteins, peptides, carbohydrates and other biomolecules, which together alter physiological and biochemical processes on the inoculated individual. Toxins, usually low molecular weight peptides, are the active components of the venoms. Toxins have been invaluable research tools that have helped to explain various physiological processes such as coagulation or the electrical properties of excitable cells. Many spider toxins are disulfide bridged peptides (DBP) of less than 10 kDa. DBP have high resistance to proteases, acid pH and high temperatures, as well as great affinity for channels such as: TRP (transient receptor potential channels), ASIC (acid-sensing ionic channels), glutamate receptors, and voltage-dependent ion channels. Bioinformatic analyzes of the transcriptome of the venom gland of the spider *Pamphobeteus verdolaga* have shown the presence of DBP, for which its potential effect on ionic currents of Ca^{2+} (I_{Ca}) and K^+ (I_K) in excitable cells has not been studied. General objective: To evaluate the effect of DBP from the transcriptome of the venom gland of the spider *P. verdolaga* on I_{Ca} and I_K in excitable cells of a murine model. **Methodology:** The isolation of cardiomyocytes and neurons of the dorsal root ganglion (DRG) was standardized by means of the Langendorff inverse perfusion system and enzymatic methods (collagenase and protease), from adult male mice of the Swiss Webster strain. The successful isolation of cardiomyocytes was verified by determining the morphological characteristics and the response to electrical stimuli. DRG neurons were validated by means of indirect immunofluorescence with the markers of the neuronal cytoskeleton NF-200 and β -III-tubulin. Cell viability was verified using the fluorescent indicator of Ca^{2+} Mag-Fluo-4. Brightfield and fluorescence images were acquired using a camera attached to

an inverted microscope, equipped with the appropriate filters. The effect of 5 DBP and 1 peptide without disulfide bridges (NDBP) on I_{Ca} and I_K in cardiomyocytes was evaluated using the patch-clamp technique, in whole cell configuration, from high-resistance seals ($>1 \times 10^9 \Omega$). Micropipettes were fabricated by polishing borosilicate capillaries to bath resistances between 1.6-2.6 M Ω and specific internal and external solutions were used to isolate the currents of interest. Peptides were supplied by a collaborating research group. For all experiments, between 3 and 6 independent replicates were made. **Results:** Abundant intact cardiomyocytes were obtained from each heart, with a shiny membrane, elongated shape, irregular ends, transverse striations, contraction to the electrical stimulus and the presence of ionic currents. Neurons from the DRG were positive for the NF-200 and β -III-tubulin markers. When loaded with the fluorescent indicator Mag-Fluo-4, showed an intensity and homogeneity of fluorescence expected for living cells. Type L Ca^{2+} ionic currents (I_{CaL}) and I_K were successfully obtained, with kinetics and current-voltage curves like those described in the literature. It was possible to evaluate the effect of the 6 peptides of interest on I_{CaL} and I_K in mouse cardiomyocytes. Peptides vrdg69 and vrdg177 had an inhibitory effect greater than 40% on both I_{CaL} and I_K , which makes them less selective peptides. vrdg183 showed an inhibitory effect greater than 66% on I_{CaL} , but negligible on I_K . vrdg164 had less than 25% inhibitory effect on I_{CaL} and I_K , but delayed I_{CaL} activation time. This may indicate that the peptide interacts with the voltage sensing domain. vrdg66, the only NDBP, inhibited 16% I_{CaL} and 24% I_K . **Discussion and conclusions:** The characterization of cell models based on morphological, molecular, and electrophysiological techniques, as well as the kinetics of the currents obtained, suggest that the results are reliable. vrdg183 and vrdg164 show promising results due to

their specific effect on I_{CaL} . This could give them potential use as antihypertensives, biotechnological tools or ion channel modulators. On the other hand, the peptides that showed no effect on channels exhibited potential antimicrobial activity. Our results suggest that they may be safe to heart, allowing them to continue their development as potential drugs. The most probable mechanism to explain the inhibition of the currents is the direct interaction of the peptide with the channel, something that must be verified in future tests using other study techniques. 111577757673, Minciencias.

1. Introducción

Los venenos animales son mezclas complejas de biomoléculas que incluyen enzimas, péptidos, proteínas y otras moléculas como aminos biogénicas, alcaloides y terpenos, que en conjunto generan una respuesta fisiológica sobre el individuo inoculado (E. Hodgson, 2012). Su composición varía enormemente entre especies y es influenciada por factores ecológicos complejos como el tipo de alimento disponible o depredadores de la especie en cuestión; a este fenómeno se le conoce como presión de selección.

En el caso de las serpientes, el efecto de su veneno es causado por péptidos de 60 a 70 aminoácidos, con efectos diversos (e.g. cardiotoxico, hemotóxico, miotóxico o neurotóxico), los cuales se ven acentuados por enzimas como fosfolipasas, peptidasas y proteasas. Los cónidos (moluscos gasterópodos) producen una mezcla de péptidos conocidos como conotoxinas, los cuales están compuestos usualmente de 10 a 40 aminoácidos, son ricos en puentes disulfuro y poseen gran afinidad por diferentes tipos de canales iónicos (Biass et al., 2009). El veneno de diferentes tipos de artrópodos, como escorpiones y arañas, además de poseer péptidos ricos en puentes disulfuro, también posee péptidos lineales sin puentes disulfuro, con diferentes propiedades como antibacterianos, antivirales, citolíticos e inmunomoduladores (Almaaytah & Albalas, 2014).

Algunas de las características mencionadas les han conferido a los venenos animales gran relevancia en la historia de las ciencias biomédicas. Estos inicialmente fueron estudiados con el interés de entender el mecanismo de acción de los envenenamientos en humanos; sin embargo, la gran diversidad de compuestos en dichos venenos ha generado gran expectativa por su utilidad para entender diversos procesos fisiológicos y

por la posibilidad de desarrollar fármacos (Bosmans, et al., 2008; Changeux, 2018; Hodgson & Isbister, 2009). Como ejemplo clásico, el estudio del veneno de la serpiente *Bothrops jararaca* llevó al descubrimiento de la Bradiquinina, un péptido que cumple un rol fundamental en la inflamación y que, en conjunto con la histamina, son mediadores de la vasodilatación (Silva et al., 1949). Este descubrimiento permitió el diseño de los primeros inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (Cushman et al., 1977), que posteriormente llevaron al desarrollo del Captopril en 1981, el primer fármaco de este tipo aprobado para uso humano. Otro ejemplo ocurre con las exendinas, las cuales son péptidos aislados del veneno de lagartos del género *Heloderma*, que han demostrado un potente efecto agonista sobre el receptor del péptido similar al glucagón (GLP-1, por sus siglas en inglés) (Göke et al., 1993). GLP-1 es una hormona que estimula la secreción de insulina y suprime la secreción de glucagón, por esta razón las exendinas son consideradas como agentes antidiabéticos. A partir de la exendina-4 se diseñó el péptido Exenatida, un fármaco aprobado por la agencia estadounidense FDA (*Food and drug administration*) para el tratamiento de la Diabetes mellitus tipo 2. Otros fármacos derivados de venenos animales se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Fármacos derivados de venenos aprobados por la FDA^a para el tratamiento de enfermedades humanas

| Fármaco | Indicación | Especie | Blanco molecular |
|---------------------|--|-------------------------------------|--|
| Captopril | Falla cardiaca congestiva e hipertensión | <i>Bothrops jararaca</i> | Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) |
| Eptifibatide | Síndrome coronario agudo | <i>Sistrurus miliarius barbouri</i> | Receptor $\alpha 11\beta 3$ |
| Tirofiban | Síndrome coronario agudo | <i>Echis carinatus</i> | Receptor $\alpha 11\beta 3$ |
| Ziconotide | Dolor crónico severo | <i>Conus magus</i> | Ca _v tipo-N |
| Exenatide | Diabetes tipo 2 | <i>Heloderma suspectum</i> | Receptor GLP-1 |

^aFDA: food and drug administration

Las toxinas pueden ser clasificadas según su estructura, en péptidos lineales sin residuos de cisteína (NDBP, por sus siglas en inglés) y péptidos con puentes disulfuro (DBP, por sus siglas en inglés). Los NDBP usualmente constan de residuos catiónicos con afinidad por membranas lipídicas, poseen estructura anfipática y pueden generar poros en dichas membranas. En solución acuosa no presentan una estructura secundaria definida, pero en condiciones hidrofóbicas presentan estructura de α -hélice (Corzo & Escoubas, 2003; Kuhn-Nentwig, et al., 2011). Los DBP poseen dos propiedades importantes: *i*) gran estabilidad (i.e. resistencia a proteasas, a pH ácido y a altas temperaturas), lo cual es deseable para el desarrollo de fármacos (Pineda et al., 2014), y *ii*) gran afinidad por canales iónicos de membrana, como canales TRP (*transient receptor potential channel*), ASIC (*acid-sensing ionic channel*), receptores de glutamato, y canales iónicos dependientes de voltaje de Na^+ (Na_v), K^+ (K_v) y Ca^{2+} (Ca_v) (King & Hardy, 2013; Pineda et al., 2014). A pesar de dichas características, la poca cantidad de veneno que se puede obtener de algunos animales, como las arañas, ha limitado su estudio. Sin embargo, el reciente desarrollo de nuevas tecnologías transcriptómicas y proteómicas ha facilitado la síntesis de sus toxinas y ha permitido su caracterización molecular y fisiológica.

Con más de 39.000 especies descritas a la fecha, las arañas son los animales venenosos más diversos del planeta, y son el centro de interés de este trabajo de grado. Se distribuyen en todos los ecosistemas de la Tierra excepto en la Antártida (Escoubas et al., 2006). La gran complejidad de sus venenos y la presencia de ligandos de alta afinidad con diversas propiedades farmacológicas permiten estudiar la localización y la función de diferentes componentes celulares tales como los canales iónicos de membrana. En

los últimos años han tomado gran relevancia para el desarrollo de diferentes tipos de fármacos, tales como: antimicrobianos (Ayroza et al., 2012; Wang et al., 2016; Yan & Adams, 1998; Zhao et al., 2011), antineoplásicos (Z. Liu et al., 2012; Nicoletti et al., 2017), analgésicos (Deuis et al., 2017; Rigo et al., 2013), entre otros. A su vez, algunas toxinas han demostrado potencial utilidad en otros campos como el sector agrícola en el diseño de bioinsecticidas (Bomgardner, 2017; D. Li et al., 2003).

En 2016 se reportó en el Valle de Aburrá, Colombia, una nueva especie de tarántula, nombrada *Pamphobeteus verdolaga* (Cifuentes et al., 2016). El estudio de la composición del veneno de esta nueva especie representa grandes oportunidades para la identificación de toxinas con potenciales utilidades en el futuro. A partir del transcriptoma de la glándula venenosa de *P. verdolaga*, los Grupos Malaria, Biofísica y PHYSIS identificaron 180 secuencias peptídicas con posible efecto antibacteriano, de las cuales 16 poseen estructura DBP. Dada esta característica, hipotetizamos que dichos péptidos deben poseer gran afinidad y efecto modulador sobre Ca_v y K_v , y por lo tanto sobre las corrientes iónicas mediadas por estos canales. Para evaluar esta hipótesis es fundamental realizar estudios electrofisiológicos de células excitables, utilizando la técnica de *patch-clamp*, la cual permite evaluar las propiedades eléctricas celulares, tales como el potencial de membrana, el flujo de corrientes iónicas y la cinética de activación/desactivación de los canales iónicos en ausencia y presencia de las moléculas de interés. En Colombia, el uso de esta técnica se ha visto limitado por la poca infraestructura y la falta de investigadores capacitados. Recientemente los Grupos de investigación PHYSIS, de la Facultad de Medicina, y Biofísica de la Facultad de Ciencias Exactas, de la Universidad de Antioquia, realizaron la adquisición y montaje de los

equipos del laboratorio de electrofisiología celular, haciendo factible el desarrollo de este trabajo, el cual a su vez es el cimiento para posteriores proyectos en venómica y otras áreas del conocimiento relacionadas.

2. Marco teórico

2.1 Potencial de membrana y potencial de acción en células excitables

La característica que define a una célula excitable es su capacidad de generar y conducir potenciales de acción. Ese cambio transitorio de potencial de membrana cumple dos funciones importantes: transmitir información o iniciar eventos celulares como la contracción muscular (Fry & Jabr, 2010). El potencial de acción posee 3 propiedades claves: *i)* es un evento todo o nada, más que una respuesta graduada, *ii)* es autopropagable a través de la membrana, y *iii)* es transitorio, pues la excitabilidad membranal es rápidamente restaurada (Fletcher, 2019).

Cuando las células excitables están en reposo, la diferencia de concentraciones iónicas entre el interior y el exterior celular, así como la permeabilidad diferencial para los iones en la membrana, crea una diferencia de potencial electroquímico. Este fenómeno en gran medida se da por la presencia de bombas y de canales iónicos transmembrana. Los principales iones involucrados en esta diferencia de potencial son Na^+ y K^+ . En células excitables, dicho potencial de membrana en reposo es de aproximadamente -80 mV , muy cercano al potencial de equilibrio iónico para K^+ . El valor negativo revela que el interior celular es negativo en relación con el exterior.

El potencial de acción inicia cuando la despolarización de la membrana alcanza el valor del potencial umbral relativo al potencial de membrana en reposo. Este estímulo inicial (químico, eléctrico, etc) activa los canales dependientes de voltaje aumentando rápidamente la permeabilidad de la membrana para los iones de Na^+ y más tarde de K^+ , principalmente. Cuando la despolarización supera el potencial umbral (aproximadamente

-65 mV), inicia la fase ascendente del potencial de acción. Los iones de Na^+ ingresan rápidamente a la célula durante el potencial de acción gracias al gradiente electroquímico que se genera por la mayor concentración extracelular de iones de Na^+ y la carga negativa relativa al interior celular (Meriney & Fanselow, 2019). Posteriormente, el poro del canal se cierra a pesar de que el estímulo que inició su apertura siga presente (Deuis et al., 2017; Xu et al., 2019), en el fenómeno conocido como inactivación. En el caso de los Na_v la inactivación impide el flujo de corriente a través de estos, lo que en conjunto con la activación de los K_v permite la repolarización de la célula. Los K_v también responden al potencial de despolarización de membrana, pero su activación es más lenta en comparación a los Na_v ; la apertura de éstos coincide con la fase de repolarización y posterior hiperpolarización del potencial de acción, en la cual de manera transitoria el potencial de membrana toma valores más negativos que el potencial de reposo. Este periodo dura hasta que los K_v se inactivan. La desactivación ocurre cuando el canal adopta la conformación cerrada del canal, una vez el estímulo que inició la apertura del canal desaparece (Oudit & Backx, 2017). Es importante entender que el comportamiento de las corrientes iónicas de K^+ (I_k) durante el potencial de acción es el resultado de la mezcla de varios tipos de corrientes en las que están involucradas diferentes isoformas. La expresión de estas varía según el tipo celular. En el presente trabajo de grado son de interés las I_k en células cardíacas (cardiomiocitos), las cuales incluyen: I_{to} , I_{Kur} , I_{Kr} , I_{Ks} e I_{K1} (Fig. 1).

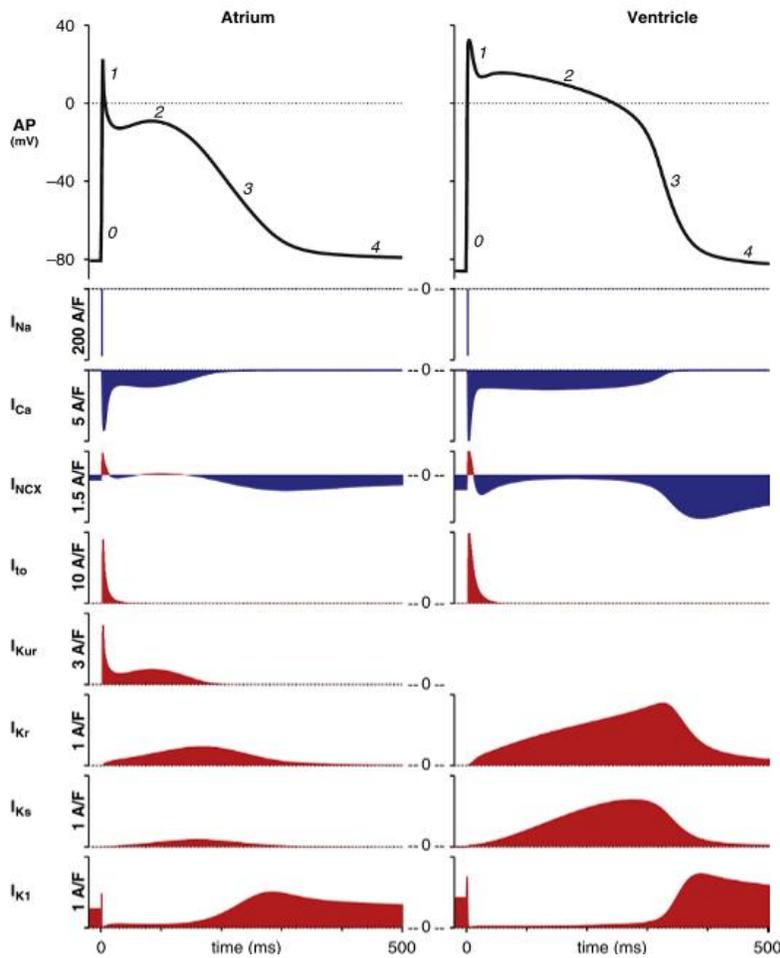


Figura 1. Potencial de acción cardíaco y corrientes iónicas involucradas. En el panel superior se presentan el potencial de acción atrial (izquierda) y el ventricular (derecha). 0, representa la fase de inicio del potencial de acción y despolarización de la membrana; 1, repolarización inicial; 2, fase de plateau; 3, fase de repolarización tardía; 4, fase de reposo o diastólica. En los demás paneles se presenta la cinética de activación de las corrientes iónicas (I) durante el potencial de acción. Las corrientes de entrada (azules) despolarizan la membrana, mientras las corrientes de salida (rojas) la repolarizan. Tomado de (Oudit & Backx, 2017)

En los cardiomiocitos, además de los Na_v y los K_v , son importantes los Ca_v , particularmente los que generan corrientes de Ca^{2+} tipo L (I_{CaL}). Existen otras isoformas Ca_v , en el tejido cardíaco, específicamente los que generan las corrientes de calcio tipo T (I_{CaT}), pero estas se expresan en células del nodo sino atrial y atrio ventricular pero no en cardiomiocitos de individuos adultos (Kumari et al., 2018). Los Ca_v tipo L se abren lento después de la fase de despolarización rápida, pero se mantienen abiertos por un tiempo largo (200-400 ms). La apertura de éstos genera el influjo de Ca^{2+} al citoplasma celular y media el acoplamiento excitación-contracción cardíaco. El balance entre el influjo de Ca^{2+} y el bajo eflujo de K^+ es el responsable del potencial de membrana observado en la fase 2, de *plateau*, del potencial de acción cardíaco (Feher, 2012; Kumari

et al., 2018). En otras células excitables, como las neuronas, los Cav cumplen un papel importante en la liberación de neurotransmisores en uniones sinápticas y contribuyen al potencial de acción dendrítico (Berridge, 1998). Las I_{CaL} son las segundas corrientes relevantes para este trabajo, debido a que su magnitud las hace medibles de manera confiable en cardiomiocitos. En conjunto, I_{Ca} e I_K tienen importantes implicaciones en biomedicina pues sus alteraciones pueden llevar a arritmias o hipotensión. Así mismo, si no hay efectos sobre estas corrientes es factible descartar preliminarmente la cardiotoxicidad de una nueva molécula, haciendo aplicables nuestros hallazgos.

2.2 Canales iónicos

Los canales iónicos en general son proteínas multiméricas transmembrana, con alta selectividad al paso de iones, y por lo tanto son las entidades moleculares responsables de las corrientes iónicas celulares. Están presentes tanto en la membrana celular externa, como en los diferentes sistemas de endomembranas. Median funciones celulares importantes como la excitación nerviosa y muscular, la secreción hormonal, la proliferación celular, la regulación de la presión arterial y el balance hídrico (Lier, 2019). Pueden ser activados por diferentes estímulos como el voltaje, presión, iones, neurotransmisores, entre otros (Weir, 2016). Aunque reconocemos la importancia de los canales de Na^+ en las células excitables, y de los otros tipos de canales no dependientes de voltaje, por las razones mencionadas arriba, este escrito está específicamente enfocado en los Cav y los Kv , responsables de las I_{Ca} e I_K , respectivamente, como sujetos experimentales de este trabajo.

2.3 Canales iónicos dependientes de voltaje

Los canales iónicos dependientes de voltaje (VGIC, por sus siglas en inglés) son las principales proteínas que definen a las células excitables: neuronas, células musculares y células secretoras. En estas células, los potenciales de acción, mediados por canales iónicos, inician diversos eventos como la neurotransmisión, la contracción muscular y la exocitosis de vesículas secretoras (Lipscombe & Toro, 2014). Estos canales son capaces de medir pequeños cambios en el potencial de membrana y desencadenar la rápida apertura y cierre del poro iónico. Son altamente selectivos a diferentes tipos de iones, dada su secuencia única y bien conservada del filtro de selectividad (SF) dentro del dominio del poro (PD). Los Ca_v están formados por un único polipéptido compuesto de 4 dominios homólogos, mientras los K_v están formados por 4 subunidades separadas no necesariamente idénticas (heterotetrámeros) (Elinder et al., 2007).

2.4 Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_v)

Los Ca_v están compuestos por una subunidad α de aproximadamente 2000 aminoácidos que se pliega en 4 dominios homólogos (DI-DIV) que forman el canal iónico. Cada dominio se organiza en 6 segmentos transmembrana con estructura α -hélice (S1-S6). El segmento S4 es el sensor de voltaje (VSD), el cual posee una secuencia de aminoácidos cargados positivamente. S4 es esencial para detectar el cambio de voltaje transmembrana e iniciar la activación o inactivación del canal. DI, DII y DIII están relacionados con la apertura del canal mientras que S4 en DIV participa en la inactivación. Durante la despolarización el S4 se mueve hacia el espacio extracelular, generando un cambio conformacional en el PD a través de las asas intracelulares y

permitiendo el paso de iones (Lipscombe & Toro, 2014). Los segmentos S5-S6 y el asa extracelular S5-S6 (P-Loop) forman el PD (Fig. 2A).

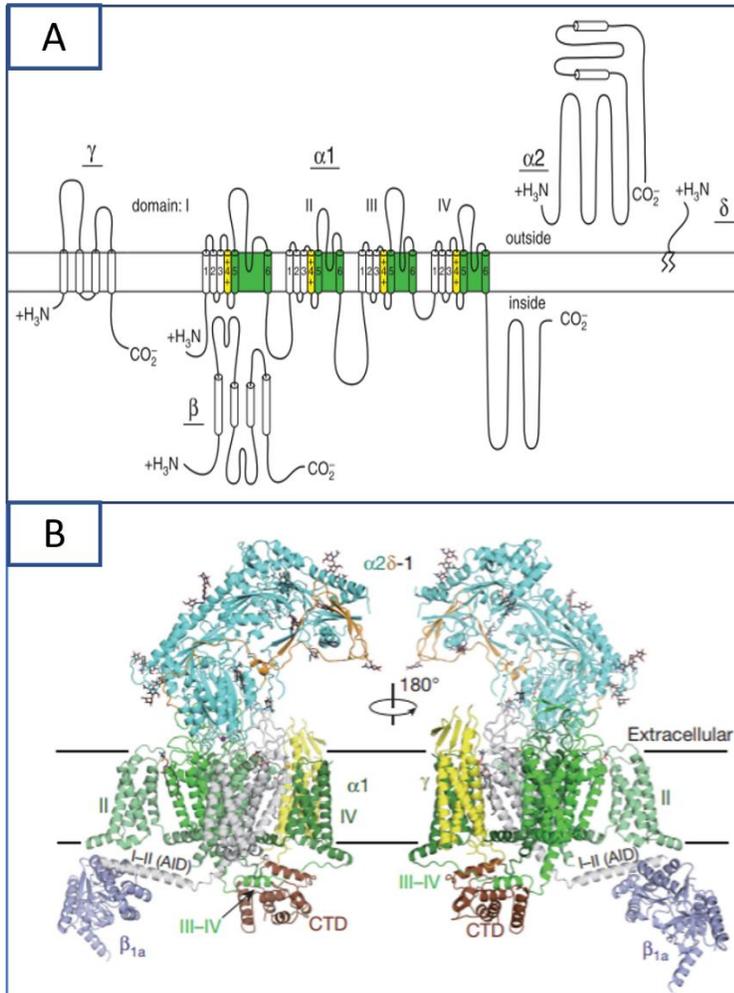


Figura 2. Estructura general de los Ca_v. **A.** I a IV indican dominios homólogos que forman la subunidad α1 del canal. Los S4 (en amarillo) de cada dominio forman el VSD; el PD está formado por las asas extracelulares de S5-S6 (en verde) y las asas intracelulares que unen cada dominio. Subunidades accesorias: α2 la cual se encuentra en el espacio extracelular, β se encuentra en el espacio citoplásmico, γ es una proteína integral de membrana y δ se une a la membrana por un ancla de glicosilfosfatidilinositol (Catterall, 2011). **B.** Estructura de Ca_v 1.1 de conejo en microscopía crioelectrónica, modelada y refinada a una resolución de 3.6 Å. Los 4 dominios homólogos (DI-DIV) se presentan de colores verde y gris. En color cian y en el espacio extracelular se presenta la subunidad α2 unida a δ1, en el espacio intracelular y en color lila se presenta la subunidad β1a. y se observa en amarillo. En color café se presenta el dominio carboxi-terminal (CTD) (Wu et al., 2016).

Cada VSD está conectado con el PD por un asa intracelular S4-S5, la cual posee secuencias, conformaciones y roles diferentes en la modulación de la apertura del poro iónico (Kushnir & Marx, 2018; Lipscombe & Toro, 2014). La región externa del poro contiene un par de residuos de glutamato en cada dominio, lo cual es requerido para la selectividad del paso de iones de Ca²⁺, una característica estructural única para este tipo de canales. El poro interno es formado por los S6 de cada uno de los cuatro dominios,

los cuales son sitios de unión para diversos antagonistas de los Ca_v . En el 2016 se estableció la estructura tridimensional del canal $\text{Ca}_v1.1$ de conejo, por medio de microscopía crioelectrónica, con una resolución refinada a 3.6 Å (Fig. 2B). La región interna de $\alpha1$ se encontró en estado cerrado mientras que los 4 VSD se encontraron en estado abierto, lo cual sugiere que el canal se encontraba inactivado (Wu et al., 2016).

Existen otras subunidades como $\alpha2$, β , γ y δ . Las cuales apenas comienza a entenderse su función sobre la expresión y regulación de la apertura y cierre del canal (Fig. 2A-B).

2.4.1 Activación, desactivación e inactivación de Ca_v

Los Ca_v son estructuras dinámicas cuyas conformaciones pueden ser clasificadas según permitan o no el paso de iones: un estado de reposo cerrado (desactivado), un estado conductor o abierto (activado) y un estado no conductor o inactivo. Durante la despolarización, VSD presenta un cambio conformacional que a su vez incluye los S5 y S6, los cuales se mueven hacia el espacio extracelular permitiendo la entrada de iones de Ca^{2+} a la célula, después de lo cual el canal se inactiva, con el VSD aún en conformación abierta, pero en un estado no conductor mediado por la compuerta de inactivación. La rapidez de este fenómeno varía ampliamente dependiendo de la isoforma involucrada. Ocurre de dos maneras: inactivación dependiente del voltaje (VDI por sus siglas en inglés) e inactivación dependiente de Ca^{2+} (CDI). Algunos canales de Ca^{2+} como los tipo L poseen CDI, que funciona como un mecanismo de retroalimentación negativa que ayuda a limitar la entrada de Ca^{2+} a la célula, de manera que el influjo de Ca^{2+} de un canal puede promover la inactivación de otro adyacente, evitando que se alcancen concentraciones altas de Ca^{2+} que puedan llegar a ser deletéreas para la célula.

La desactivación ocurre durante la repolarización, en esta fase del potencial de acción el canal adquiere la configuración cerrada (Piedras-Rentería, Barrett, Cao, & Tsien, 2007).

2.4.2 Isoformas de C_{av}

Los diferentes tipos de I_{Ca} son definidos principalmente por los diferentes tipos de subunidades α_1 , las cuales son divididas estructural y funcionalmente en 3 familias: C_{av} 1, C_{av} 2 y C_{av} 3. C_{av} 1 se asocia a las corrientes tipo L (C_{av} 1.1 a 1.4), C_{av} 2 a corrientes tipo N (C_{av} 2.1), tipo P/Q (C_{av} 2.2) y tipo R (C_{av} 2.3) y C_{av} 3 a corrientes tipo T (C_{av} 3.1 a 3.3). En la Tabla 2 se presentan las isoformas aisladas de C_{av} , su función y los tejidos donde se expresan.

Las corrientes tipo T pueden distinguirse de la tipo L por poseer un potencial de activación más negativo (-70 mV vs -40 mV), conductancia baja de un único canal y sensibilidad baja a los bloqueantes clásicos de los canales tipo L (Dihidropiridinas) (Kushnir & Marx, 2018). En cardiomiocitos ventriculares, C_{av} 1.2 es abundante, alcanza la amplitud pico a potenciales entre 0 y +10 mV y es activado a potenciales superiores a los -40 mV. En mamíferos el tiempo de inactivación en cardiomiocitos ventriculares es bifásico, presentan inactivación rápida (τ_f) e inactivación lenta (τ_s); la primera con leve dependencia del voltaje y valores de τ_f entre 12 y 16 ms (-20 a +25mV), la segunda con fuerte dependencia de voltaje y valores de τ_s entre 133 y 577 ms (+10 a +25 mV) (Mewes & Ravens, 1994). Comparada con C_{av} 1.2, C_{av} 1.3 presenta un umbral de activación más negativo y una tasa más lenta de inactivación. Estas propiedades permiten un influjo de Ca^{2+} más prolongado que contribuye a la actividad marcapasos del nodo sino atrial (Kushnir & Marx, 2018).

Tabla 2. Tipos de corrientes de Ca^{2+} , Ca_v y su función.

| Tipo de corriente | Isoforma (Ca_v) | Bloqueante | Función |
|-------------------|----------------------------|--|---|
| L | 1.1 | Dihidropiridinas | AEC ^a en músculo esquelético |
| | 1.2 | Fenilalkilaminas Benzodiacepinas Dihidropiridinas | AEC en músculo cardiaco y liso, secreción endocrina, transitorios de Ca^{2+} en cuerpos neuronales y dendritas |
| | 1.3 | Calciseptina | Secreción endocrina, marcapasos cardiaco, transitorios de Ca^{2+} en cuerpos neuronales y dendritas |
| | 1.4 | | Transducción visual |
| N | 2.1 | ω -Agatoxinas IVA & B ω -Conotoxinas MVIC & D | Liberación de neurotransmisores, transitorios de Ca^{2+} dendríticos |
| P/Q | 2.2 | ω -Agatoxinas CVIA & B | Liberación neurotransmisores, transitorios de Ca^{2+} dendríticos |
| R | 2.3 | SNX-482 | Liberación neurotransmisores, transitorios de Ca^{2+} dendríticos |
| T | 3.1 | (+)-ECN (Kurtoquina) | Marcapasos |
| | 3.2 | | Marcapasos |
| | 3.3 | | Marcapasos |

^aAEC: acoplamiento excitación-contracción. Tomado de: (Catterall, 2011; Kushnir & Marx, 2018)

2.5 Canales de K^+ dependientes de voltaje (K_v)

Los K_v poseen 4 subunidades α , cada una compuesta por seis segmentos transmembrana con terminales intracelulares amino y carboxilo (Fig. 3). En general, al igual que los Ca_v , poseen dominios VSD, PD y SF. El SF está formado por residuos de glicina (G)-tirosina (Y)-glicina (G) más los oxígenos de la cadena lateral de la treonina formando la secuencia TXGYG, en donde X representa un residuo variable.

Los oxígenos están organizados simétrica y rígidamente para garantizar la interacción óptima con los iones de K^+ (Oudit & Backx, 2017).

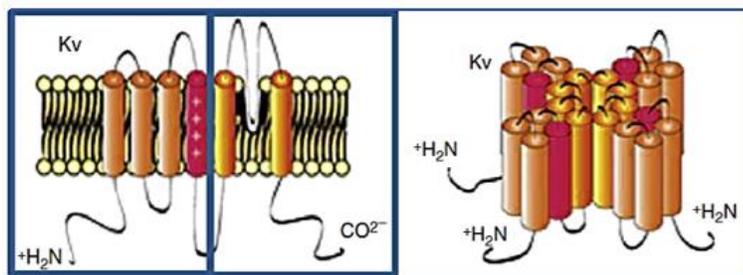


Figura 3. Estructura general de los K_v . Las subunidades α de K_v son proteínas integrales de membrana con seis segmentos transmembrana (izquierda). Las 4 subunidades α se ensamblan como tetrámeros (derecha) con un poro central (Oudit & Backx, 2017).

Estos canales poseen gran variedad de subunidades accesorias, con funciones regulatorias diferentes según el tipo de canal. Las subunidades β fueron las primeras estudiadas y a la fecha se han descrito 4 ($K_v\beta 1-4$), las cuales poseen múltiples variantes por *splicing* alternativo (Pongs et al., 1999). Cada subunidad β contiene un núcleo conservado y un péptido N-terminal variable; éstas se expresan de forma diferencial según el tejido. Otras proteínas reguladoras incluyen al KChAP (*Kv channel-associated protein*), un miembro de la familia de factores de transcripción de unión a proteínas, que se unen a la región citoplasmática N-terminal de K_v incrementando la expresión del canal (Kuryshv et al., 2000). Otras subunidades, como KChIP, KCNE, NCS, and DPPX, regulan la actividad de la subunidad α a través de diferentes mecanismos (Oudit & Backx, 2017).

2.5.1 Activación, desactivación e inactivación del canal de K_v

La activación del canal involucra cambios conformacionales del VSD dentro de cada uno de los monómeros en respuesta a la despolarización de la membrana, que finalmente lleva a la apertura del canal. Los movimientos de S4 hacia el espacio extracelular (despolarización) inducen cambios conformacionales de S5-S6 (PD) a través del asa S4-S5, que finalmente permiten el paso de iones a través del canal. El mecanismo de inactivación en K_v es complejo y ocurre tanto a nivel funcional como estructural, pero en cualquier caso la recuperación de la inactivación usualmente ocurre cuando el potencial de membrana regresa a su valor inicial (repolarización). Varios mecanismos de inactivación han sido descritos: tipo-N, tipo-C/P, tipo-AG y tipo-U, pero su discusión va más allá de objetivo del presente escrito. Estos se describen en la revisión realizada por Oudit y colaboradores (Oudit & Backx, 2017).

2.5.2 Isoformas de K_v

Según la homología de sus subunidades α se han descrito 40 diferentes miembros agrupados en 12 subfamilias ($K_v 1x-K_v 12.x$). Los $K_v 5$, $K_v 6$, $K_v 8$, y $K_v 9$ son canales silentes que no producen entidades funcionales cuando forman homotetrámeros. Algunas clases de estos canales contienen un solo miembro y la mayoría de los genes que los codifican surgen de *splicing* alternativo. Las clases silentes son más promiscuas y pueden co-ensamblarse con $K_v 2$, de esta manera se modifican sus propiedades biofísicas y se crean una gran variedad de canales heteroméricos (Grandi et al., 2017; Gutman et al., 2005). En el Anexo 1 se presentan las diferentes isoformas de K_v y en qué tejidos se expresan.

2.5.3 Corrientes iónicas de K^+ (I_K) en el corazón

En cardiomiocitos existen dos tipos de I_K : transitorias de salida (I_{to}) y rectificadoras retrasadas (I_{K1}). I_{to} se activa rápidamente y contribuye a la fase 1 del potencial de acción. A su vez I_{to} es separada en I_{tof} e I_{tos} , ambas con tiempos de activación similar, pero con diferentes tiempos de inactivación ($\tau_{inact} \approx 25-80$ ms para I_{tof} y $80-200$ ms para I_{tos}) y recuperación de la inactivación ($\tau_{rec} \approx 25-80$ ms para I_{tof} y $1-2$ s para I_{tos}) (Oudit et al., 2001). Las I_{K1} son importantes en las fases posteriores del potencial de acción (fases 3 y 4), al asegurar repolarización hasta el potencial de reposo. Puede ser separada en más corrientes como: I_{Kur} , I_{Kr} e I_{Ks} , las cuales son generadas por diferentes subunidades α de K_v . En la Tabla 3 se presentan los diferentes tipos de I_K en el corazón y la fase del potencial de acción en donde intervienen.

Tabla 3. Principales isoformas involucradas en los tipos de corrientes de K⁺ en el corazón

| Corrientes | Expresión en tejido | Fase del Potencial de Acción | Isoformas |
|------------------|--------------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| I _{tof} | Atrios, ventrículos, fibras Purkinje | Fase 1 | K _v 4.2/4.3 |
| I _{tos} | Ventrículos | Fase 1 | K _v 1.4/1.7/3.4 |
| I _{Kur} | Atrios | Fase 2 | K _v 1.5/3.1 |
| I _{Kr} | Ventrículos | Fase 3 | K _v 11.x (hERG) |
| I _{Ks} | Ventrículos | Fase 3 | K _v 7.1 |

Tomado de: (Gutman et al., 2005).

2.5.3.1. Corriente transitoria de salida de K⁺ (I_{to}): Se caracteriza por ser sensible a 4-aminopirimidina (4-AP). Contribuye a la fase 1 de repolarización. La densidad de esta corriente es mayor en atrios que ventrículos y 3-4 veces mayor en células de miocardio medio y subepicárdicas que en células subendocárdicas (Li & Dong, 2010). Posee una influencia importante sobre las I_{CaL}, por lo tanto, modula el acoplamiento excitación-contracción del músculo cardíaco. Alteraciones en I_{to} pueden generar cambios en la duración del potencial de acción y favorecer la aparición de arritmias (Oudit et al., 2001). En ratones, la densidad de I_{tof} en miocitos es mayor en el ventrículo derecho que en el izquierdo, mientras que I_{tos} sólo se detecta en septum (Brunet et al., 2004).

2.5.3.2. Corriente rectificadora retrasada (I_{K1}): Esta corriente cumple un rol importante en la repolarización e inicio del potencial de acción. Puede ser separada en 3 componentes con cinéticas y características farmacológicas definidas: corrientes rectificadoras ultrarrápida (I_{Kur}), rápida (I_{Kr}), y lenta (I_{Ks}).

I_{Kur} también es conocida como I_{ss} o I_{sus}, se caracteriza por activarse rápido e inactivarse lento, además de ser sensible a inhibición por 4-AP pero no a tetraetilamonio (TEA). En humanos y ratones la isoforma involucrada es KCNA5 (K_v 1.5) mientras que en caninos es la isoforma KCNC1 (K_v 3.1). En humanos se expresa únicamente en atrios, mientras

que en ratones tanto en atrios como en ventrículos y de forma predominante en atrio izquierdo (Nakamura et al., 2010).

I_{Kr} se caracteriza por una rápida activación a -30 mV y rápida inactivación. La isoforma involucrada en este tipo de corriente es la hERG (K_v 11.1), en humanos se expresa tanto en atrios como en ventrículos. Contribuye principalmente a la fase 3 de repolarización del potencial de acción. El bloqueo de esta corriente prolonga la duración del potencial de acción atrial y ventricular (Prolongación del intervalo QT). Este fenómeno ocurre en mayor medida en células miocárdicas en comparación a células subendocárdicas y subepicárdicas, lo que genera pérdida en la homogeneidad en la repolarización de la pared ventricular, y promueve la aparición de taquicardias ventriculares e incluso fibrilación ventricular (Raschi et al., 2009; Tamargo et al., 2004).

I_{Ks} se activa lentamente casi sin inactivación, contribuye a la fase 2 de repolarización del potencial de acción. En ausencia de estimulación adrenérgica juega un papel importante en aumentar la duración del potencial de acción en cardiomiocitos ventriculares (Jost et al., 2005). Se activa a potenciales positivos a -30 mV, con una relación corriente-voltaje lineal, alcanzando la mitad de la máxima activación a +20 mV. Las corrientes de I_{Ks} son generadas por canales conformados por 4 subunidades de KCNQ1 (K_v 7.1) y dos subunidades β KCNE1. Se ha observado disminución en la expresión de estos canales en corazones con falla cardiaca de caninos y humanos (Li & Dong, 2010).

El estudio de canales iónicos incluye: purificarlo, caracterizar su estructura y peso molecular, caracterizar su función y sus mecanismos de activación e inactivación. Técnicas como la cromatografía, espectrometría de masas, microscopía electrónica, cristalografía de rayos X y la bioinformática de proteínas, han sido esenciales para

entender la biología estructural de estos macrocomplejos proteicos (Levinson & Sather, 2012; Martinez-Ortiz & Cardozo, 2018; Wisedchaisri et al., 2019). Sin embargo, funcionalmente son las técnicas electrofisiológicas las que han permitido entender cómo se transmiten los impulsos eléctricos en células excitables y cuáles son los mecanismos de activación e inactivación de los canales iónicos. Entre ellas *patch-clamp* es la de mayor importancia y la que se usará en este trabajo, por lo cual será descrita a continuación.

2.6 La técnica de *patch-clamp*

Esta técnica permite la medición de corrientes iónicas a través de la membrana plasmática. La técnica se basó en los trabajos pioneros realizados por Alan Hodgkin y Andrew Huxley en 1950, quienes lograron registrar corrientes macroscópicas en axones de calamar gigante, controlando el voltaje de la membrana (Hodgkin & Huxley, 1952). Sin embargo, estos trabajos tenían la limitante de ser incapaces de estimar corrientes iónicas a través de un tipo de canal o de un único canal. Esto no fue posible hasta 1976, cuando Neher y Sakmann desarrollaron la técnica del *patch-clamp*, la cual permitió registrar por primera vez en un área muy pequeña de la membrana de una célula muscular de rana un canal activado por acetilcolina (ACh) (Neher & Sakmann, 1976). Posteriormente en 1981, los mismos autores en conjunto con otros investigadores publicaron en la revista *Pflügers Archiv* el protocolo refinado de la técnica que se utiliza actualmente, el cual mejoró de manera importante su resolución. Describieron los diferentes tipos de ruido presentes, además de las diferentes configuraciones de registro de corrientes y sus potenciales aplicaciones en diversos tipos celulares (Hamill et al.,

1981). Por sus descubrimientos en torno a la función de canales iónicos en células recibieron el premio Nobel en 1991 (The Nobel Prize, 1991).

Patch-clamp permite medir corrientes de membrana de toda la célula (llamadas corrientes macroscópicas), pero también cambios en la actividad de un único canal (corrientes microscópicas), así como las propiedades cinéticas de los canales iónicos (rapidez con la que se abren y cierran) (Conforti, 2012; Sachs & Auerbach, 1983). Esta técnica ha permitido el descubrimiento de activadores e inhibidores de diversos tipos de canales (Gualdani et al, 2017; Larsson et al, 2000; Sun et al, 2019; van der Peet et al, 2019), predecir su comportamiento (Metri et al, 2019) e incluso caracterizar canales iónicos, no sólo en la membrana plasmática sino en otras endomembranas como los endolisosomas (Chen et al., 2017). Con esta técnica es posible medir corrientes iónicas a través de la membrana cuando el voltaje se mantiene constante. Dichas corrientes derivan del movimiento de cargas generado a su vez por el movimiento de los iones a través de los canales. Este principio provee las bases biofísicas de *patch-clamp* (Kornreich, 2007).

La corriente total medida en la membrana depende de las propiedades capacitivas de la membrana y de las corrientes iónicas.

$$I_t = I_C + \sum I_x$$

Con I_C la corriente capacitiva, e I_x la corriente generada por cada ion. A su vez, la I_C depende de la capacitancia de membrana (C_m)

$$C_m = \epsilon A/d$$

Donde ϵ es la constante dieléctrica, A es el área de membrana y d el grosor de la membrana. La corriente iónica depende de la conductancia (g_x) y de la diferencia entre el voltaje de membrana (V_m) y el potencial de reversión (V_x) para cada ion.

$$I_x = g_x (V_m - V_x)$$

Las magnitudes de V_m y V_x se pueden modular experimentalmente mediante el control de voltaje aplicado por la técnica de *patch-clamp*, y de las concentraciones de iones en los espacios intra y extracelular (Carter et al. 2015). Para mayor detalle de los principios biofísicos y las ecuaciones que aplican se remite al lector a otras fuentes (Conforti, 2012; Hamill et al., 1981; Polder et al., 2005).

Para medir las corrientes generadas por el flujo de iones a través de toda la membrana, se utiliza la configuración *whole-cell* y se fijan potenciales predeterminados a partir de un potencial de reposo conocido como *holding potential*. Los datos obtenidos en estos experimentos pueden graficarse en curvas de corriente vs voltaje (I-V), las cuales muestran los cambios de corriente registrados a un voltaje determinado durante un periodo de tiempo. Por convención, para cationes como el Na^+ y el Ca^{2+} , corrientes con un valor negativo se refieren a corrientes de entrada (*inward*), mientras que aquellas con valor positivo, como suelen ser la de K^+ , son conocidas como corrientes de salida (*outward*). La pendiente de la curva I-V refleja la conductancia de la membrana/canal para el ion que se está midiendo. Los resultados de I_x se normalizan con respecto a los valores de C_m , para corregir por el tamaño celular. Si se desea medir la conductancia de un ion específico, deben usarse agentes farmacológicos para aislar canales específicos o hacer mediciones utilizando otras configuraciones.

2.6.1 Descripción de la técnica y configuraciones de registro

La técnica convencional consiste en crear un sello entre una micropipeta y una pequeña porción de la membrana plasmática aislando dicha porción (*patch* o en español, parche) del resto de la membrana. De esta manera se logra controlar el voltaje y realizar mediciones de las corrientes iónicas a través de los canales en el sello. Si el sello se rompe, entonces se establece una configuración que permite controlar el voltaje en toda la célula, conocida como *whole-cell*. Las micropipetas son usualmente de vidrio de borosilicato con una punta de un diámetro de 1-5 μm , y contienen una solución salina conductora en contacto con un electrodo de registro (cable Ag/AgCl), lo cual les confiere una resistencia en el baño, o solución extracelular, típicamente entre 1.5-5 M Ω . Una vez obtenidas las corrientes estas se amplifican y se digitalizan (Fig. 4).

Las configuraciones más conocidas, que permiten realizar diferentes tipos de mediciones de las corrientes iónicas (Fig. 4), son:

2.6.1.1. *Cell-attached*: consiste en posicionar la pipeta sobre la célula con ayuda de un micromanipulador, seguido de la aplicación de una leve presión negativa (succión) para formar un sello, que se traduce en una resistencia muy alta, típicamente de 1-2 G Ω , llamado gigasello (Fig. 4A). Con esta configuración es posible realizar la medición de corrientes iónicas provenientes de un único canal (corrientes microscópicas). Su principal desventaja consiste en que no es posible estimar el potencial de reposo, el cual se suma al potencial aplicado por la pipeta (Rycroft et al., 2006).

2.6.1.2. *Inside-out*: partiendo de la configuración *cell-attached*, el “parche” de la membrana puede ser desprendido manteniendo el gigasello, de esta manera se expone el interior de la célula a la solución del baño y el exterior de la membrana a la solución

de la pipeta (Fig. 4B). Ha demostrado ser útil para evaluar el efecto de constituyentes citoplasmáticos y segundos mensajeros sobre la actividad de un canal determinado (Conforti, 2012; Rycroft et al., 2006).

2.6.1.3. Perforated-patch: permite la medición de corrientes macroscópicas. Esta técnica se consigue a partir de la configuración *cell-attached*, pero la pipeta contiene antibióticos como la anfotericina B o nistatina, los cuales tienen la propiedad de generar poros en la membrana, permitiendo de esta manera acceso eléctrico al interior celular (Fig. 4C). Estos poros son permeables a iones, pero no a moléculas grandes, lo cual previene la diálisis celular entre el contenido de la micropipeta y el interior celular. La principal desventaja de esta configuración es que la resistencia de acceso es usualmente mayor en comparación a *whole-cell*. Esto genera una disminución del control del voltaje y en la resolución de la corriente, y por consiguiente una menor relación señal a ruido (Conforti, 2012; Rycroft et al., 2006).

2.6.1.4. Whole-cell: permite medir corrientes macroscópicas al igual que *perforated-patch*, pero no se usan antibióticos para generar poros en la membrana. Esta configuración se obtiene rompiendo la zona de la membrana que se encuentra en contacto con la pipeta en la configuración *cell-attached*, mediante una leve pero rápida succión (Fig. 4D). Permite estimar el promedio de las propiedades eléctricas de la célula (C_m , resistencia de membrana (R_m) y resistencia de acceso (R_a)). Ya que el interior celular es perfundido con la solución de la pipeta, tiene la desventaja de diluir algunas moléculas intracelulares que pueden ser importantes para la regulación de los canales iónicos (Conforti, 2012; Kornreich, 2007).

2.6.1.5. *Outside-out*: esta configuración se obtiene a partir de *whole-cell*, en donde se retira lentamente la pipeta de la célula, la membrana se estira y se pliega sobre si misma exponiendo la cara interna de la membrana hacia la solución interna en la pipeta y la cara externa hacia la solución de baño (Fig. 4E). Esta configuración permite realizar registros de un único canal (*single-channel*), y es útil para evaluar el efecto de diferentes fármacos sobre las proteínas en la cara interna de la membrana.

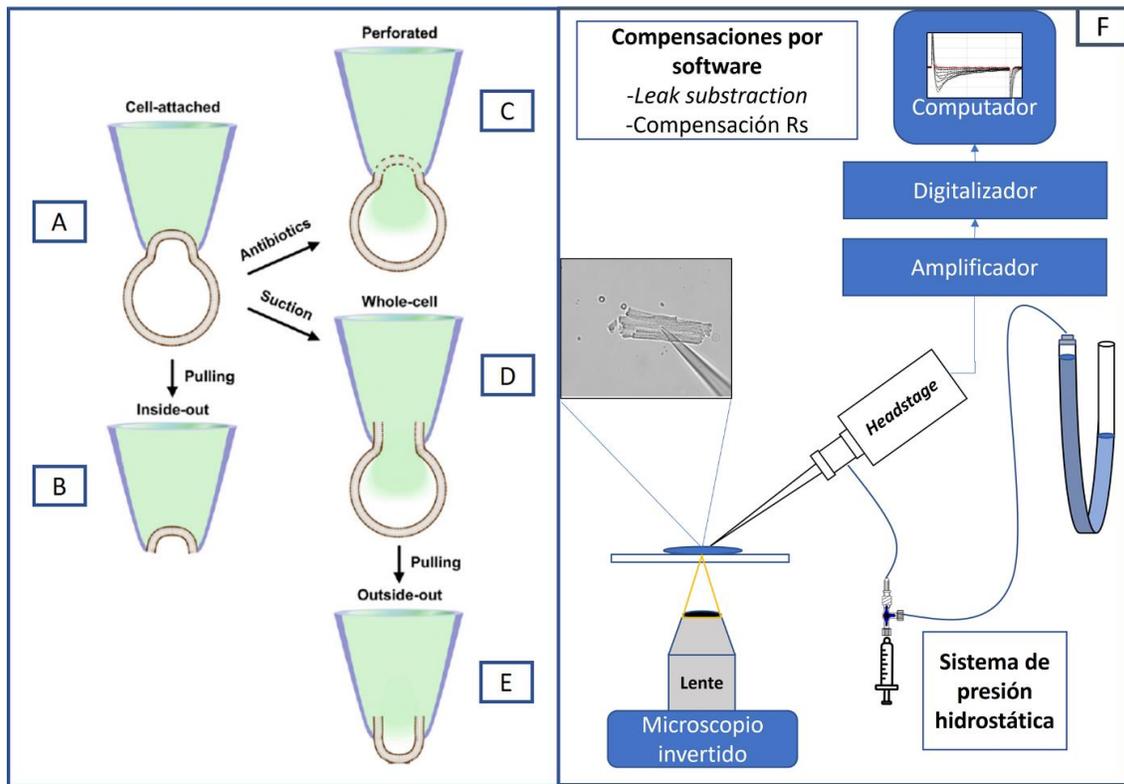


Figura 4. Configuraciones de registro y setup de la técnica de patch-clamp. A. Cell-attached. B. Inside-out. C. Perforated patch. D. Whole-cell. E. Outside-out (Conforti, 2012). Partiendo de la configuración Cell-attached se obtienen las demás. F. Setup de patch-clamp. Se observa una pipeta haciendo sello sobre la membrana de un cardiomiocito. La señal obtenida se amplifica y digitaliza. El sistema de presión hidrostática ayuda a conservar el sello por más tiempo. Ver el texto para mayor detalle.

2.6.2 Aislamiento de corrientes iónicas

En la presente investigación es de interés medir las corrientes iónicas macroscópicas de Ca^{2+} y K^+ mediante *patch-clamp* en la configuración *whole-cell* y en el modo *voltage-clamp*. Sin embargo, cuando la membrana celular es despolarizada al imponer determinado potencial de membrana, diferentes tipos de canales pueden ser activados simultáneamente. Por esta razón es necesario utilizar técnicas para poder separar los diferentes componentes de las corrientes que fueron activadas por el mismo pulso de voltaje.

La primera de estas técnicas consiste en utilizar bloqueadores selectivos de corrientes iónicas. Por ejemplo, si se deseara medir I_{CaL} , podría usarse tetrodotoxina (TTX) para bloquear corrientes de Na^+ (I_{Na}) y TEA para bloquear I_{K} . Sin embargo, el uso de estos agentes genera varios inconvenientes. Uno de ellos es que algunas de estas moléculas afectan parcialmente las corrientes de interés, como sucede cuando se bloquea I_{Na} , lo cual influencia el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX). La disminución de la actividad I_{Na}/Ca aumenta el valor de $[\text{Ca}^{2+}]$ en el citoplasma, lo cual afecta I_{CaL} (Polder, Weskamp, Linz, & Meyer, 2005). Esta aproximación sólo es posible si se conocen todas las corrientes intervinientes y si existen bloqueantes para cada una de ellas.

La segunda manera es bloqueando de manera selectiva la corriente de interés. Esta aproximación se logra registrando la suma de todas las corrientes durante un protocolo de *voltage-clamp*, luego se bloquea de manera selectiva la corriente de interés y se ejecuta el mismo protocolo. De esta manera puede calcularse la diferencia punto por punto entre ambas corrientes; el resultado corresponderá a la corriente de interés. Este procedimiento puede realizarse utilizando bloqueantes selectivos de I_{CaL} , como

nifedipina. Sin embargo este método también posee inconvenientes; al igual que en la aproximación anterior, la influencia del NCX al bloquear I_{CaL} afectará de manera indirecta dicha corriente (Polder et al., 2005). La principal ventaja es que la primera medición sin bloqueante se realiza bajo condiciones normales.

La tercera aproximación consiste en la activación selectiva de los canales iónicos. Debido a que algunas corrientes tienen diferentes umbrales, pueden ser activadas con diferentes protocolos de *voltage-clamp*. Este método es útil si queremos medir corrientes diferentes a I_{Na} , I_{CaT} o I_{to} , aprovechando que éstas últimas se activan a potenciales más negativos a -35 mV. Un *pre-clamp* de -35 mV antes del *test-clamp* permitirá inactivar estas corrientes sin alterar las corrientes de interés (por ejemplo I_{K1}), que se activarán a potenciales más positivos a los -35 mV (Polder et al., 2005).

Algunos de los moduladores de canales iónicos más relevantes tienen su origen en venenos animales. Estos moduladores, conocidos como toxinas, se han evaluado ampliamente con *patch-clamp* para estudiar el efecto electrofisiológico sobre canales iónicos, lo cual no sólo ha permitido el descubrimiento de nuevos tipos de canales iónicos, sino también los mecanismos fisiológicos involucrados en su activación y desactivación (Deuis et al., 2017; Levinson & Sather, 2012; van der Peet, Sandanayake, Jarrott, & Williams, 2019).

2.7. Modelos celulares

2.7.1 Cardiomiocitos

Son las células funcionales del corazón, que a diferencia de las células musculares esqueléticas que pueden decenas de núcleos, tienen entre 1 y 2 núcleos; en humanos

aproximadamente el 50% de los cardiomiocitos son binucleados, mientras que en roedores pueden serlo el 90% (Gerdes, 2012). La longitud media de un cardiomiocito ventricular es de 120-150 μm (Fig. 5A).

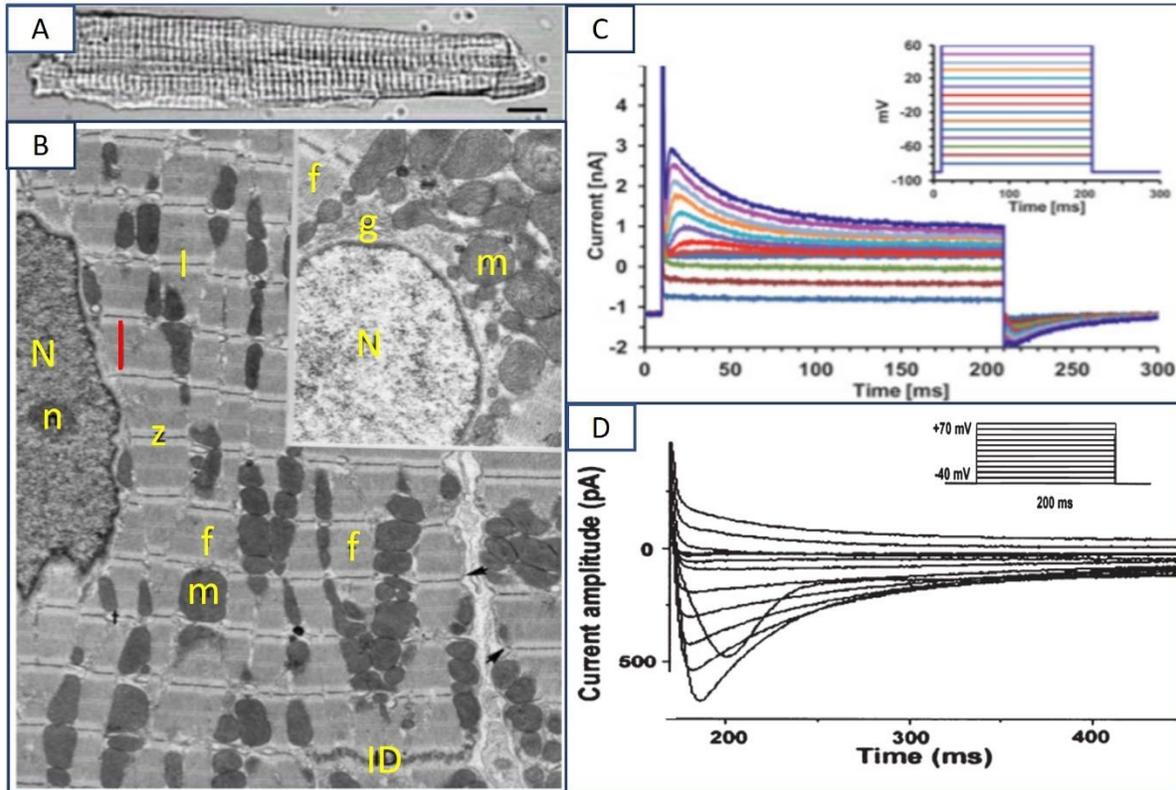


Figura 5. Caracterización morfológica y electrofisiológica de un cardiomiocito murino. A. Fotografía en campo claro de cardiomiocito de rata. Barra de calibración: 10 μm . **B.** Fotografía de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de corazón de rata, se observan las mitocondrias (m) organizadas de forma lineal entre miofibrillas (f), núcleo (N) central y nucleolo (n). Patrón sarcomérico estriado compuesto de bandas A (línea roja larga arriba a la izquierda, B, 1.5 μm), bandas I (línea amarilla vertical) y discos Z (Z). Las flechas abajo a la derecha marcan el sarcolema de dos cardiomiocitos adyacentes. Discos intercalados (ID) forman conexiones entre dos células y sitio de inserción de los miofilamentos. En imagen inserta se observa Golgi perinuclear (g), mitocondria (m) y miofibrillas adyacentes (Gerdes, 2012). **C.** Cinética de la I_K en un cardiomiocito a potenciales desde -90 mV a +60 mV con aumento de +10 mV entre cada potencial probado (Nesher et al., 2014). **D.** Cinética de la I_{CaL} en un cardiomiocito a potenciales desde -40 mV a +70 mV con aumento de +10 mV entre cada potencial probado (Zhang et al., 2011).

Están conectadas entre sí por uniones conocidas como discos intercalados. En mamíferos, la principal diferencia subyace en el número de células, mientras que su

volumen y tamaño es muy similar. Las miofibrillas son las organelas más abundantes en el corazón (ocupa 50-60% del citoplasma), están compuestas de miofilamentos que se superponen en unidades repetidas llamadas sarcómeros. Discos compuestos principalmente de α -actina, forman los límites del sarcómero y provee el anclaje a los filamentos delgados (1 μm de longitud y 8 nm de grosor) (Gerdes, 2012) (Fig. 5B). Los cardiomiocitos de murinos son un excelente modelo de célula excitable por ser ricos en I_{CaL} e I_{K} , lo cual justifica su elección como modelo celular para este trabajo de grado. En ellos se hizo la caracterización morfológica, electrofisiológica y la evaluación del efecto de las toxinas. En la Fig. 5C se observa una corriente macroscópica de K^+ sin diferenciar las diferentes corrientes intervinientes (I_{to} , I_{Kur} , I_{Kr} , I_{Ks}), y en el panel 5D se presenta una I_{CaL} en cardiomiocito de ratón, similares a las publicadas en la literatura.

2.7.2 Neuronas del ganglio espinal (DRG)

Los ganglios espinales se encuentran localizados a lo largo de las raíces dorsales de los nervios espinales cervicales, torácicos, lumbares y sacros. En estos se encuentran localizadas neuronas pseudo-unipolares de las cuales sale una neurita del soma que luego se bifurca en un axón que se dirige al sistema nervioso central (SNC) y otro proceso (dendrita) que inerva órganos periféricos. La información sensitiva proviene de estructuras somáticas (e.g. piel) y viscerales (e.g. órganos y cavidades). Estas células son redondeadas, contienen un núcleo central y nucleolo prominentes, con abundantes complejos de Golgi y cisternas de retículo endoplásmico rugoso (RER), los cuales forman agregados conocidos como cuerpos de Nissl (Haven, 2009; Marani, 2017). Estas células son protegidas por células de soporte o satélites, equivalentes a la neuroglia en SNC, las cuales son pequeñas y firmemente asociadas al soma neuronal (Papka, 2009) (Fig. 6A).

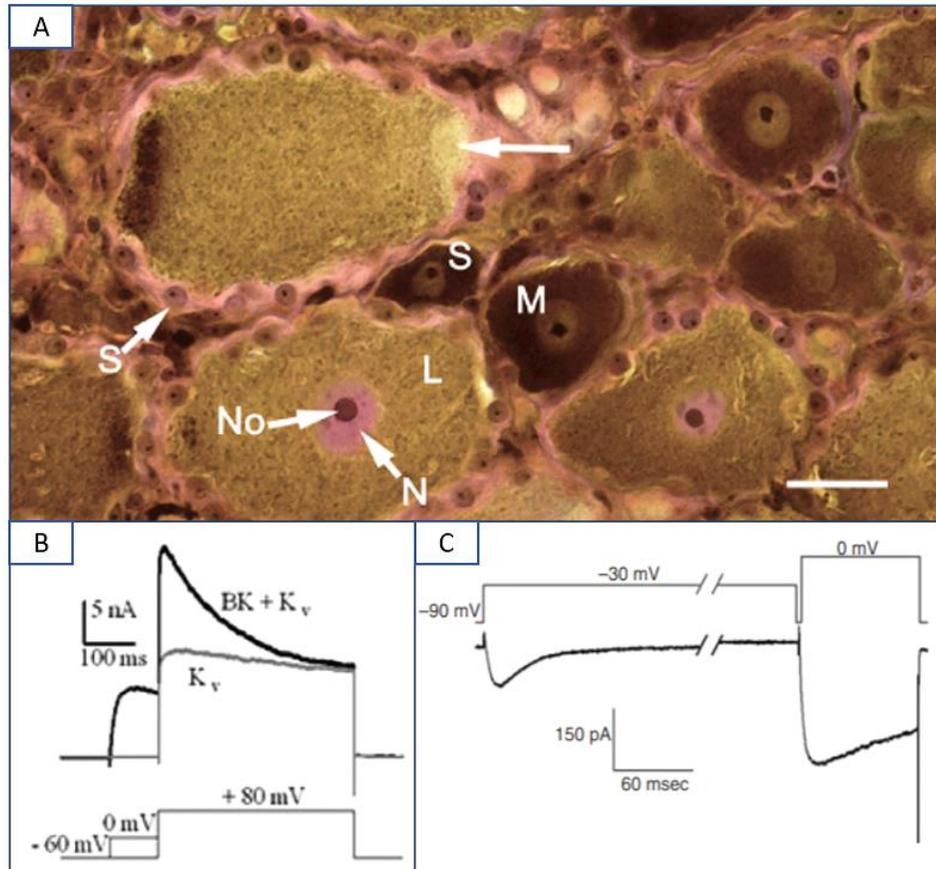


Figura 6. Caracterización morfológica y electrofisiológica de neuronas del ganglio espinal (DRG) de ratón. **A.** Corte histológico de ganglio espinal. Se observan neuronas pequeñas (S), medianas (M) y grandes (L). Asociadas a las neuronas se observan células satélites (S junto a flecha), las cuales aíslan las neuronas del tejido conectivo extracelular y les proveen soporte. Barra de calibración: 25 μm (Papka, 2009). **B.** Registro de *patch-clamp* de I_K activados por voltaje (K_v) y activados por Ca^{2+} (BK) en neuronas del DRG. K_v fue obtenida al substrair la corriente obtenida por solución externa convencional menos una solución con 0 mM Ca^{2+} . Corriente evocada a partir de potenciales de despolarización de 0 mV y +80 mV desde un potencial de reposo de -60 mV (Li et al., 2006). **C.** Registro de *patch-clamp* de I_{Ca} en neuronas del DRG. Corriente evocada a partir de potenciales de despolarización de -30 mV y 0 mV desde un potencial de reposo de -90 mV (Gandini, Sandoval, & Felix, 2018).

Las poblaciones neuronales en el DRG son heterogéneas y se clasifican en 3 poblaciones: pequeñas (<20 μm), medianas (21-40 μm) y grandes (>40 μm). Las pequeñas carecen de mielina y tienen procesos no mielinizados (0.3-1.3 μm) y baja

velocidad de conducción (0.7-2.3 m/s) conocidas como fibras C. Las medianas tienen procesos levemente mielinizados (1.7-7 μm) y velocidad moderada (3-15 m/s) conocidas como fibras A- δ . Las grandes tienen procesos fuertemente mielinizados (7-15 μm) y son las más rápidas (20-80 m/s), llamadas fibras A- β y A α (Papka, 2009). Las I_K de estas poblaciones celulares son diversas e intervienen tanto en la fase de despolarización como repolarización del potencial de acción (Tsantoulas & McMahon, 2014). En la Fig. 6B se presenta una I_K (K_v) y una corriente de K^+ activada por Ca^{2+} (BK), las cuales se pueden diferenciar por la presencia y ausencia de Ca^{2+} en su solución externa. Las neuronas expresan I_{Ca} tipo P/Q, N, R y T de manera diferencial, dependiendo del tipo de neurona y el estadio fisiológico (Kushnir & Marx, 2018). En la Fig. 6C se observa una típica I_{Ca} en estas células.

2.7.2.1 Caracterización morfológica, identificación y viabilidad celular de neuronas:

Debido a que los DRG incluyen diversas poblaciones celulares como: neuronas, células satélites y células de tejido conectivo (Papka, 2009), es necesario realizar una caracterización morfológica e identificación usando marcadores moleculares específicos de estas células. Para ello se pueden realizar experimentos de inmunofluorescencia indirecta con dos marcadores específicos: Neurofilamento 200 (NF-200) y β -III-tubulina (Tuj-1). El neurofilamento 200 pertenece a un grupo de filamentos intermedios de tipo IV, constituyentes fundamentales del citoesqueleto neuronal y son particularmente abundantes en los axones. DRG expresan principalmente NF de alto peso molecular (200 kDa), en comparación a los de medio (155 kDa) y bajo (68 kDa) peso molecular (Gebhart, 2013). La disminución de la expresión o mutaciones de esta proteína se han

asociado a múltiples enfermedades como esquizofrenia, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (Haven, 2009; Papka, 2009). El anticuerpo monoclonal de ratón Tuj-1, es ampliamente usado para identificar poblaciones celulares de origen neuronal y reconoce tanto la forma fosforilada como no fosforilada de β -III-tubulina (Zuchero, 2014). Este isotipo de tubulina se expresa tanto en neuronas del sistema nervioso periférico como central y contribuye a la estabilidad y transporte de los microtúbulos axonales. Tuj-1 no se expresa en células nerviosas embrionarias, pero sí en neuronas posterior a la mitosis terminal, por lo cual es considerada como uno de los marcadores asociados al desarrollo completo del citoesqueleto neuronal (Katsetos, Legido, Perentes, & Mörk, 2003). Este fue el segundo modelo de interés en este trabajo de grado. Sin embargo, para enmarcar los ensayos dentro del alcance experimental y de duración de un trabajo de grado de Maestría, se estandarizó el aislamiento y la caracterización molecular de las neuronas del DRG, pero no se hizo su descripción electrofisiológica ni la evaluación del efecto de las toxinas.

2.8 ¿Qué son las toxinas?

En el reino animal existe gran variedad de venenos, los cuales permiten a los individuos aumentar sus probabilidades de obtener alimento o de defenderse de depredadores. Sin embargo, se sabe que algunos depredadores pueden desarrollar resistencia a algunos de ellos a través de mutaciones en receptores o produciendo activamente antitoxinas. Por esta razón, la presión selectiva mantenidas sobre las especies productoras de venenos, permiten modificaciones permanentes en la composición del mismo (Biardi & Coss, 2011; Geffeney, 2002).

Las toxinas son moléculas aisladas del veneno completo de cierta especie animal, las cuales tiene efectos específicos sobre el individuo afectado. Están compuestas de cadenas polipeptídicas diversas, con gran variedad de tamaño, peso molecular y selectividad a diferentes isoformas de canales iónicos. Estas han sido de gran interés científico por décadas, pues han permitido entender fenómenos biológicos de adaptación y evolución de diferentes especies. Las toxinas constituyen herramientas farmacológicas importantes para la investigación y el diseño de agentes terapéuticos de diversas patologías, debido a su gran afinidad por diferentes tipos de receptores y canales iónicos (Kozlov, 2018). Después de una corta contextualización sobre algunas toxinas de diferentes fuentes animales, cuyo blanco principal son los canales iónicos, nos enfocaremos en las toxinas provenientes de arañas.

2.8.1 Toxinas y canales iónicos

Algunas toxinas de diversas especies animales han permitido entender la estructura tridimensional de ciertos canales iónicos. La toxina MitTx derivada del veneno completo de la serpiente coral texana (*Micrurus tener tener*), se une de manera selectiva a los canales catiónicos ASIC1a, los cuales se encuentran principalmente en células de tejido nervioso central y periférico. Utilizando esa propiedad, se pudo definir la estructura cristalina en estado abierto de ASIC1a (Baconguis et al., 2014).

Los caracoles marinos de la familia Conidea abarcan algunas de las especies animales con mayor variedad de toxinas con afinidad por canales iónicos. Los venenos de estas especies normalmente constan de péptidos lineales y proteínas pequeñas plegadas con un tamaño relativo de 600-800 Da, los cuales son conocidos como conopéptidos o conotoxinas (Favreau & Stöcklin, 2009). Estos conopéptidos han demostrado gran

versatilidad para la modulación selectiva de diversos tipos de canales iónicos, entre los que se incluyen N_{av} , K_v y Ca_v (Chen et al., 2021; Scanlon et al., 1997; Yang et al., 2017).

Los escorpiones son arácnidos pertenecientes al orden Scorpiones. Sus toxinas ejercen un efecto principalmente neurotóxico por inhibición de múltiples canales iónicos. Las toxinas más relevantes por su efecto sobre mamíferos son aquellas que generan inhibición de los N_{av} . Estas pueden ser clasificadas en dos tipos principales: α -toxinas (retrasan la inactivación de los N_{av}) y las β -toxinas (desencadenan la apertura de los N_{av} a potenciales de acción más negativos que el valor fisiológico) (Ortiz et al., 2015), sin embargo existen otras toxinas que inhiben otro tipos de canales como CmERG1, proveniente el escorpión colombiano *Centruroides margaritatus*, la cual demostró recientemente, a una concentración de 1 μ M, un efecto inhibitorio completo sobre el canal de K^+ hERG, sin afectar el tiempo de apertura o cierre del canal (Beltrán-Vidal et al., 2021). Otro ejemplo es la toxina ImKTx96, derivada del escorpión *Isometrus maculatus*, la cual demostró un potente efecto inhibitorio sobre K_v 1.2 mediante *patch-clamp* (Li et al., 2019). Otras toxinas aisladas de escorpiones también tienen efecto sobre canales de Ca^{2+} y Cl^- (Ortiz et al., 2015).

2.8.2 Toxinas provenientes de arañas

Las arañas son arácnidos pertenecientes al orden Araneae. Son especies ampliamente diversas, se encuentran distribuidas en todos los continentes excepto en la Antártida y pueden sobrevivir en gran variedad de ecosistemas que van desde los desiertos hasta regiones alpinas, convirtiéndose en los invertebrados terrestres más exitosos en el planeta, después de los insectos. La gran mayoría usa veneno para matar o paralizar su presa como propósito principal, pero este también puede tener efecto de predigestión.

Sus toxinas pueden ser agrupadas, según su peso molecular, en tres clases principales: moléculas orgánicas de bajo peso molecular (menor a 1 kDa), péptidos (entre 3-10 kDa) y proteínas de alto peso molecular (> 10 kDa). El estudio de los péptidos es el de mayor interés por su especificidad y selectividad, convirtiéndolos en potenciales moléculas para el desarrollo farmacológico (Israel et al., 2017).

Algunos péptidos de estos venenos tienen efectos sobre Na_v , K_v y Ca_v , TRP, ASIC y canales mecano-sensibles (Rash & Hodgson, 2002; Saez & Herzig, 2019).

2.8.3 Péptidos aislados de arañas con efecto sobre Ca_v

Los péptidos mejor caracterizados bloqueantes de Ca_v son las ω -Agatoxinas, provenientes de la araña *Agelenopsis spp*, veneno que inhibe la liberación de gran variedad de neurotransmisores. Estas varían entre 5-10 kDa, se clasifican de acuerdo con su homología y espectro de actividad sobre insectos o vertebrados. Tipo I y II ω -AGTX son selectivas para Ca_v de insectos, tipo III son inactivas para insectos pero se unen a todas las Ca_v1 y Ca_v2 (Nicholson, 2013).

El péptido PhTx3-4 aislado de la tarántula *Phoneutria nigriventer* bloquea los Ca_v de alto voltaje (HVA; canales de Ca^{2+} Tipo L, N, P/Q y R) con baja especificidad. Este ha demostrado efectos neuroprotectores y antinociceptivos en modelos de ratón de dolor inflamatorio persistente, revertiendo el estado nociceptivo a una dosis de 30 pmol por sitio de inyección intratecal, sin generar alteraciones motoras en los individuos tratados (Da Silva et al., 2015).

Otras toxinas provenientes de arañas moduladoras de Ca_v han sido descritas de migalomorfos (ω -TRTX-Gr1a y ω -TRTX-Hg1a) y araneomorfos (ω -CNTX-Cs1a, ω -SGTX-Sf1a, ω -FLTX-Kh1a, ω -PLTX-Pt1a) (Nicholson, 2013).

2.8.4 Péptidos aislados de arañas con efecto sobre K_v

La Hanatoxina (HaTx), proveniente de la Tarántula chilena (*Grammostola spatulata*), es un péptido modificador de apertura (*gating modifier* en inglés) del canal K_v 1.2. Este se une al canal en la región S3b empujándolo hacia el N-terminal de S4, lo que genera reducción de libertad de movimiento de S4 e inhibición de la apertura del PD (Huang et al., 2007; Swartz & MacKinnon, 1995). Otros péptidos aislados de las tarántulas africanas *Stromatopelma calceata* (ScTx1) y *Hetroscodra maculata* (HmTx1, HmTx2) también actúan como modificadores de apertura de K_v . HmTx1 demostró capacidad de inhibir los canales K_v 2x, mientras que ScTx1 demostró capacidad de inhibir de forma selectiva K_v 2.1 y K_v 2.2. HmTx2 fue el primer péptido descrito con la capacidad de inhibir K_v 4.1 de forma selectiva (Escoubas et al., 2002). Se han descrito otras toxinas con capacidad de modular los K_v , como las heteropodatoxinas (HpTx 1-3) provenientes de *Heteropoda venatoria*, las cuales prolongan el potencial de acción de I_{to} (K_v 4.2), disminuyendo la velocidad de activación del canal e inactivación, a la vez de modificar la dependencia del voltaje de la inactivación a potenciales más positivos (Sanguinetti et al., 1997).

2.8.5 Otras aplicaciones de toxinas de arañas

Entre las posibles aplicaciones del estudio de estas toxinas, el tratamiento anticáncer es una de las más prometedoras. Licosina-1 aislado de la araña *Lycosa singoriensis* ha demostrado potente inhibición del crecimiento de células tumorales *in vitro* y la supresión del crecimiento del tumor en modelos *in vivo*. El efecto de este péptido se asoció a dos

mecanismos: la activación de la vía apoptótica mitocondrial y al aumento en la expresión del p27, llevando de esta manera a la apoptosis y disminución de la proliferación de células tumorales (Liu et al., 2012).

El fenómeno de la resistencia antimicrobiana es uno de los mayores problemas de salud pública en la actualidad. Los péptidos antimicrobianos derivados de animales se han convertido en una alternativa para esta problemática. El péptido Oh-defensina, aislado de la araña *Ornithocnonus hainana*, ha demostrado efecto antimicrobiano de amplio espectro sobre bacterias gram-positivas, gram-negativas y levaduras (Zhao et al., 2011). Juruina, derivado de *Avicularia juruensis*, demostró actividad antifúngica contra levaduras como *Candida glabrata*, un patógeno comúnmente resistente a los azoles (Ayroza et al., 2012). Licosina-I también ha sido evaluado por su potente efecto antimicrobiano. *In vitro* se ha observado efecto contra bacterias Gram+, Gram- y algunas especies de hongos. *In vivo* ha mostrado potente efecto bactericida en un modelo murino de infección por *S. aureus* (Tan et al., 2013; Yan & Adams, 1998).

2.8.6 Péptidos con puentes disulfuro

Los DBP son los compuestos dominantes en los venenos de las arañas. Éstos tienen en común el motivo estructural nudo inhibitorio de cisteína (ICK), el cual se forma por tres láminas antiparalelas estabilizadas por puentes disulfuro. Los residuos de cisteína y cadenas laterales forman un núcleo hidrofóbico. Esta configuración permite la máxima presentación de los aminoácidos al solvente. Péptidos de este tipo usualmente tienen en su superficie áreas con cargas positivas y negativas, los cuales interactúan con su receptor. Esta configuración tridimensional en la que se exponen los aminoácidos permite gran variabilidad de las propiedades farmacológicas de cada péptido (Escoubas,

2000). Estos tienen gran afinidad por receptores postsinápticos y uniones periféricas neuromusculares o en sinapsis del sistema nervioso central de insectos. Tienen la capacidad de modular diferentes tipos de canales iónicos entre los que se incluyen canales TRP, ASIC, receptores de glutamato, transportadores de glutamato, BK, Nav, Kv, y Cav (King & Hardy, 2013).

2.8.7 *Pamphobeteus verdolaga*

El género *Pamphobeteus* incluye 12 especies de tarántulas distribuidas en el norte de Sur América, principalmente en la región andina, aunque también pueden encontrarse en el bosque lluvioso amazónico. A partir del estudio realizado por Estrada-Gómez y colaboradores en el año 2013 con especímenes de *Pamphobeteus aff. nigricolor* tomados de Medellín, Colombia, se logró identificar posteriormente por análisis taxonómicos detallados que dichos especímenes pertenecían a una especie no identificada previamente. Esto se estableció comparando holotipos y especímenes adicionales; la nueva especie fue designada recientemente como *Pamphobeteus verdolaga* (Cifuentes et al., 2016).

A partir del transcriptoma de la glándula venenosa de *P. verdolaga* y de su análisis bioinformático, los Grupos Malaria, Biofísica y PHYSIS identificaron por primera vez 180 secuencias peptídicas con posible efecto antibacteriano, de las cuales 16 poseen estructura DBP. A lo largo de este documento presentamos abundante evidencia que demuestra que múltiples DBP provenientes de arañas y otros animales modulan canales iónicos, sin embargo, el potencial regulador de los DBP de *P. verdolaga* sobre canales iónicos y sus corrientes asociadas no se ha explorado. Nosotros proponemos que los DBP de *P. verdolaga* pueden modular Cav y Kv, y por lo tanto las corrientes mediadas

por estos canales, en mamíferos. El objetivo de nuestro trabajo experimental fue evaluar el efecto de DBP seleccionados de *P. verdolaga* sobre I_{CaL} e I_K en un modelo de célula excitable de murino, mediante *patch-clamp* en modo *voltage-clamp* y en la configuración *whole-cell*.

3. Pregunta de investigación

¿Cuál es el efecto de péptidos con estructura DBP derivados del transcriptoma de la glándula venenosa de *P. verdolaga* sobre I_{CaL} e I_K en células excitables de murinos?

4. Hipótesis

Péptidos con estructura DBP derivados del transcriptoma de la glándula venenosa de la araña *P. verdolaga* poseen efecto modulador, ya sea activador o inhibidor, sobre I_{CaL} e I_K en células excitables de un modelo murino.

5. Objetivos

5.1 General

Evaluar el efecto de péptidos con estructura DBP provenientes del transcriptoma de la glándula venenosa de la araña *P. verdolaga* sobre I_{CaL} e I_K en células excitables de un modelo murino.

5.2 Específicos

- Estandarizar la obtención de cardiomiocitos y neuronas del ganglio de la raíz dorsal espinal (DRG) de ratón como modelos de células excitables.
- Estandarizar la técnica patch-clamp y caracterizar las I_{CaL} y las I_K en cardiomiocitos de ratón.
- Evaluar mediante *patch-clamp* el efecto de 5 péptidos con estructura DBP sintetizados a partir del transcriptoma de la glándula venenosa de la araña *P. verdolaga* sobre las I_{CaL} y las I_K en cardiomiocitos de ratón.

6. Metodología

6.1 Animales y aspectos éticos

Se emplearon ratones macho *Swiss Webster* con edad entre 4-6 semanas y con un peso entre 22-26 g. Los animales tuvieron ciclos de luz-oscuridad de 12:12 horas y acceso libre a agua y comida, en cajas de polipropileno con cama de viruta, sin enriquecimiento del medio. El sacrificio se realizó mediante la técnica de dislocación cervical. Todos los procedimientos con los animales fueron aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación con animales de la Universidad de Antioquia (acta de la sesión 129 del 29 de octubre de 2019).

6.2 Diseño experimental

El diseño experimental del presente estudio constó de 3 fases claramente definidas (Fig. 7). La primera consistió en la estandarización del aislamiento de neuronas del ganglio espinal (Fig. 7B-D) y cardiomiocitos (Fig. 7E-G), utilizando enzimas y técnicas de fluorescencia, a partir de ratones *Swiss Webster* (Fig. 7A). La segunda fase consistió en la preparación de micropipetas con la resistencia en el baño adecuada para *patch-clamp* en configuración *whole-cell* para cardiomiocitos (Fig. 7H-I). La tercera fase consistió en los experimentos propios de *patch-clamp*, en donde se caracterizaron electrofisiológicamente y farmacológicamente las I_{CaL} e I_K y se probó el efecto de péptidos derivados del transcriptoma de la glándula venenosa de *P. verdolaga* sobre dichas corrientes (Fig 7J-L). En las próximas secciones se explica con más detalle cada una de estas fases. En el caso de las neuronas solo se llegó a la fase de estandarización del aislamiento, pues teniendo en cuenta el alcance de un trabajo de Maestría se decidió continuar el trabajo electrofisiológico sólo con cardiomiocitos.

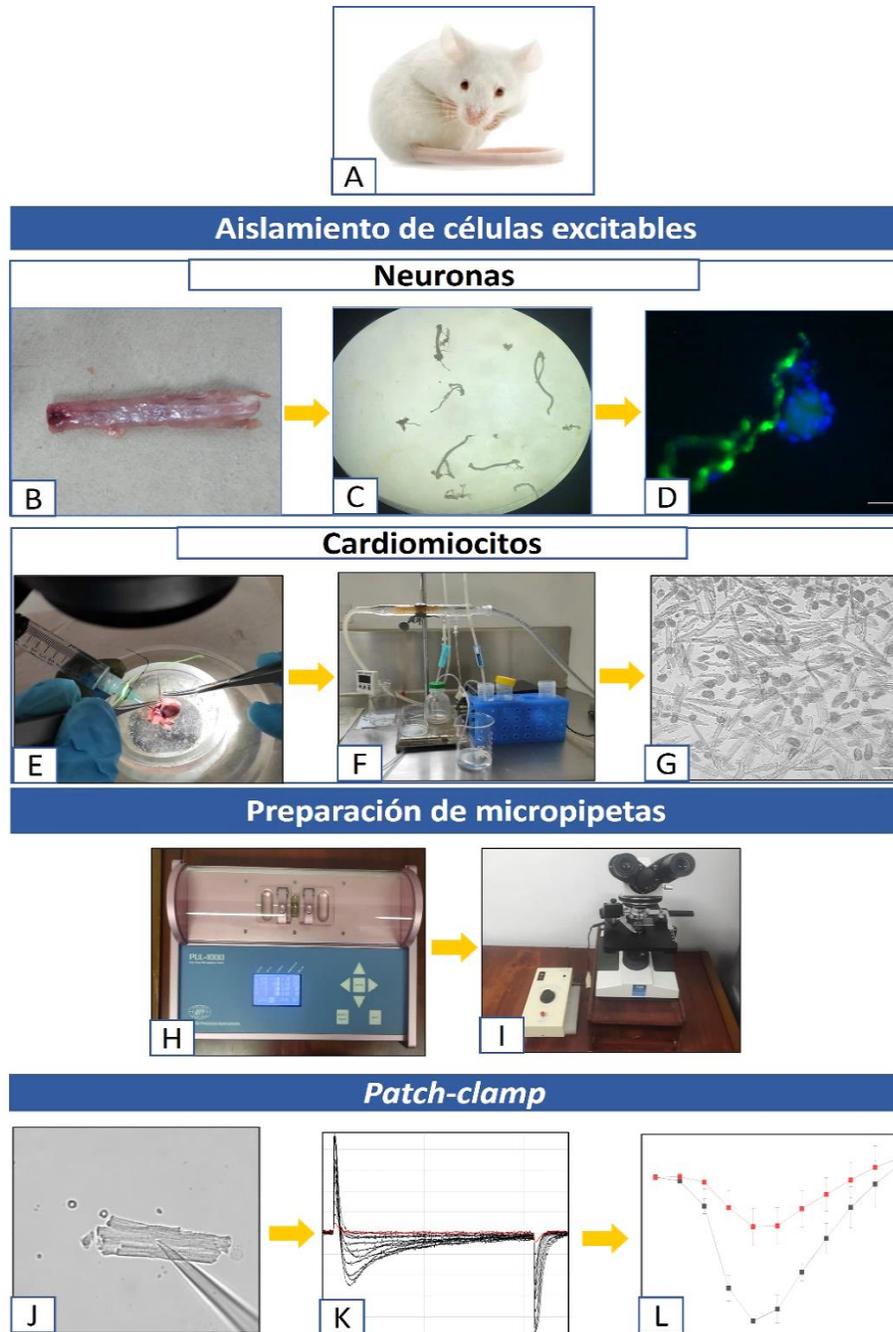


Figura 7. Resumen del diseño experimental. **A.** Ratón Swiss Webster adulto como modelo murino. **B.** Extracción de columna vertebral. **C.** Ganglios espinales en solución Tyrode 0 Ca^{2+} y posterior tratamiento enzimático. **D.** Identificación y caracterización de neuronas mediante inmunomarcaje con NF-200 y Tuj-1. **E.** Extracción del corazón y posterior canulación de la aorta. **F.** Digestión enzimática en sistema Langendorff. **G.** Disociación mecánica del corazón y obtención de cardiomiocitos en suspensión en solución Tyrode 0 Ca^{2+} . **H.** Fundido de micropipetas. **I.** Pulido de micropipetas con filamento de microforja. **J.** *Whole-cell patch-clamp* en modo *voltage-clamp*. **K.** Análisis de corrientes iónicas. En la imagen se observa una típica I_{CaL} . **L.** Análisis de corrientes antes (negro) y después (rojo) de la aplicación de péptidos a la solución externa.

6.3 Soluciones y reactivos

6.3.1 Aislamiento de cardiomiocitos y neuronas

Para la disección, canulación y posterior montaje en sistema de perfusión inversa Langendorff de cardiomiocitos y para la disección, extracción de ganglios espinales y disociación enzimática de neuronas se utilizó solución Tyrode 0 Ca^{2+} (mM): 135 NaCl, 5.4 KCl, 1 MgCl_2 , 10 Glucosa, 10 HEPES, 0.33 NaH_2PO_4 , pH: 7.2 ajustado con NaOH.

6.3.2 Medición de I_{CaL}

Se utilizó como solución externa (mM): 140 TEA-Cl, 1 MgCl_2 , 6 CsCl, 1 CaCl_2 , 10 HEPES, 10 glucosa, pH: 7.4 ajustado con CsOH. Como solución interna (mM): 125 CsCl, 10 EGTA, 11 HEPES, 5 MgATP, pH: 7.1 ajustado con CsOH.

6.3.3 Medición de I_{K}

Se utilizó Tyrode 1 mM de Ca^{2+} como solución externa. Como solución interna (mM): 140 KCl, 2 MgCl_2 , 4 MgATP, 5 EGTA, 10 HEPES, pH: 7.2 ajustado con KOH.

6.3.4 Enzimas y fármacos

Se utilizó Colagenasa tipo II (Worthington, LS004176, USA), Proteasa tipo XIV (Sigma, P5147, USA) y Tripsina (Sigma, T4174). Como anticoagulante se utilizó Enoxaparina sódica (Clenox, 60 mg/0.6 ml).

6.3.5 Inmunofluorescencia en DRG

6.3.5.1 Solución tampón de fosfato (PBS) en mM: 137 NaCl, 4.3 Na_2HPO_4 , 1.4 KH_2PO_4 , pH: 7.35 ajustado con NaOH.

6.3.5.2 *Solución de permeabilización*: 0.7% Triton X-100 (15 ml); 105 µl Triton X-100 diluídos en 15 ml de PBS.

6.3.5.3 *Solución de lavado*: 0.04% Triton X-100, 0.2% albúmina bovina (BSA, 30 ml); 0.06 g BSA, 12 µl Triton X-100, diluídos en 30 ml de PBS.

6.3.5.4 *Solución de bloqueo*: 1-2% BSA, 2% suero de cabra, 0.4% Triton X-100 (15 ml); 0.15-0.3 g BSA, 12 µl Triton X-100, diluídos en 30 ml de PBS.

6.3.5.5 *Solución de bloqueo modificado*: 0.2-2% BSA, 0.04% Triton X-100 (15 ml); 0.03-0.15 g BSA, 6 µl Triton X-100, diluídos en 15 ml de PBS.

6.3.5.6 *Anticuerpos*: *Primarios*: Anti-Neurofilament heavy polypeptide antibody (NF-200) (Abcam, ab8135, USA), producido en conejo. Anti-tubulin (β -III) (DSHB, 6G7), producido en ratón. *Secundarios*: AlexaFluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) (Sigma, A11001). AlexaFluor 594 goat anti-rabbit IgG H+L (Abcam, ab150080).

6.3.6 Experimentos de viabilidad neuronal

Se utilizó Mag-Fluo-4 AM (Thermo Fisher, M14206, USA)

6.4 Procedimientos experimentales

6.4.1 Aislamiento de cardiomiocitos

Con el objetivo de obtener cardiomiocitos aislados para experimentos de *patch-clamp*, se utilizó el método de sistema de perfusión inversa Langendorff, el cual permite mantener el corazón en condiciones similares a las fisiológicas, conservando la integridad celular mientras se lleva a cabo una disociación enzimática de las uniones intercelulares (Bell et al., 2011; Skrzypiec-Spring et al., 2007). A continuación, se explica la metodología utilizada.

6.4.1.1 Extracción de corazón y canulación: posterior al sacrificio de los ratones se realizó un corte a ambos lados de la parrilla costal, exponiendo la cavidad torácica (Fig. 8A). Se fijó el corazón y pulmones con pinzas curvas, se levantaron con cuidado hacia el investigador y se realizó un corte en sentido caudo-craneal procurando dejar la aorta lo más larga posible. Una vez extraídos el corazón y los pulmones se suspendieron en un beaker con 10 ml de solución Tyrode 0 Ca^{2+} fría y 0.1 ml de Enoxaparina sódica (1 mg/ml). Se agitaron delicadamente en dicho recipiente y posteriormente se llevaron a una cámara de disección con superficie de gel (Fig. 8B). Los pulmones se fijaron con pines metálicos, exponiendo la cara ventral del corazón. Con ayuda de un estereomicroscopio (STEMI 508, Carl Zeiss, Alemania) y precaución para no seccionar la aorta, se retiró con tijeras la grasa pericárdica que se encuentra alrededor de los grandes vasos y la aurícula izquierda. Una vez expuesta la aorta se realizó un corte transversal del cayado aórtico justo encima del tronco braquiocefálico. Con dos pinzas se tomaron los extremos de la aorta y se dirigieron hacia la cánula (Fig. 8C), fabricada con una aguja calibre 21G, previamente cortada a la mitad y pulida para evitar los bordes filosos. Con una mano se sujetaron la aorta y la cánula con una pinza, y con la otra se perfundió el corazón con 1 ml de solución Tyrode 0 Ca^{2+} . Cuando la cánula se encuentra en la aorta es evidente cómo las arterias coronarias son vaciadas de sangre por la solución y toman un color rosa pálido. En este punto se fijó la aorta con la cánula usando un hilo encerado (hilo dental) y se procedió a pasar 4 ml más de solución y se verificó la salida de la sangre restante presente en las cámaras atriales y ventriculares. Finalmente se retiró la jeringa y se fijó la cánula al sistema de perfusión inversa Langendorff (Fig. 8D).

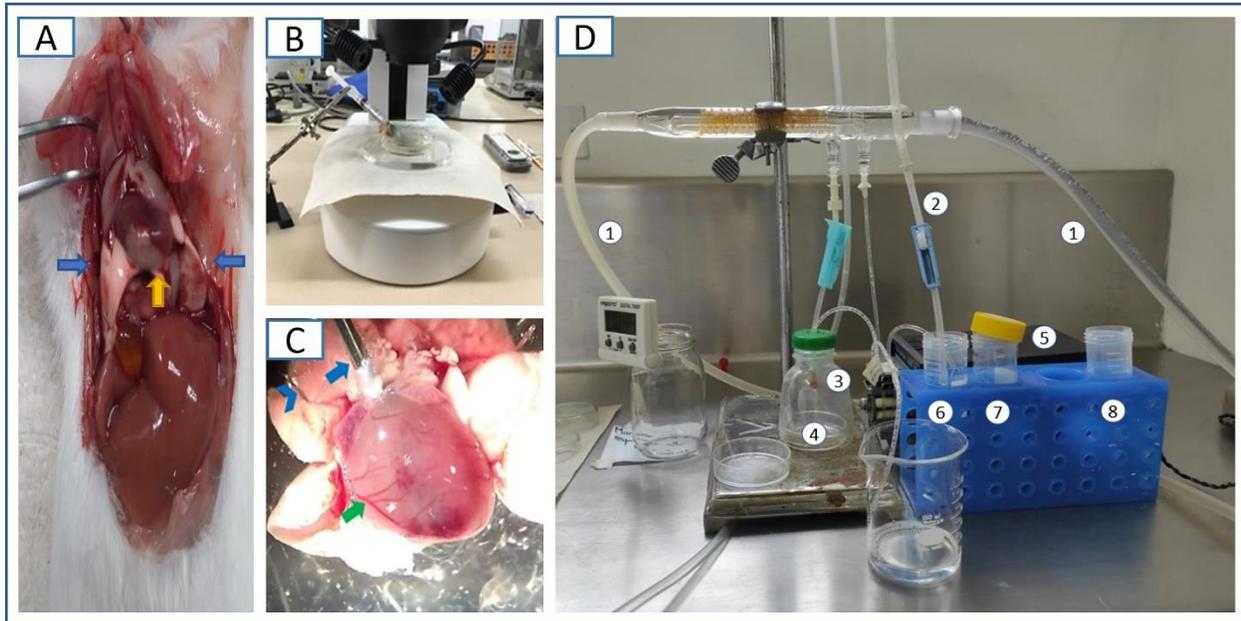


Figura 8. Montaje experimental para el aislamiento de cardiomiocitos. **A.** Corazón expuesto posterior a toracotomía. La flecha amarilla señala el corazón y las flechas azules señalan los pulmones **B.** Montaje para canulación de corazón con ayuda de estereomicroscopio. **C.** Corazón canulado vía aorta. La flecha azul señala la cánula en la aorta, las flechas verdes señalan la circulación coronaria previo a la perfusión con solución Tyrode 0 Ca^{2+} . La cabeza de flecha azul señala el pin que sostiene fijos los pulmones. **D.** Sistema de perfusión inversa Langendorff: **1.** Sistema de tuberías de agua caliente proveniente de baño de temperatura controlada ($39.5\text{ }^{\circ}\text{C}$). **2.** Circuito gaseoso O_2 (95%) y CO_2 (5%). **3.** Corazón montado en el sistema. **4.** Cámara térmica (temperatura de salida soluciones $37\pm 0.3\text{ }^{\circ}\text{C}$). **5.** Bomba de perfusión de dos canales. **6.** 30 ml solución Tyrode 0 Ca^{2+} (lavado 1). **7.** 10 ml solución Tyrode 0 Ca^{2+} + 10 mg Colagenasa tipo II y 1 mg de Proteasa tipo XIV. **8.** 30 ml solución Tyrode 0 Ca^{2+} (lavado 2).

6.4.1.2 Disociación enzimática del corazón en el sistema Langendorff: durante el tiempo de disociación enzimática es crítico mantener condiciones estables como el pH, la temperatura y la concentración de O_2 , para garantizar el mayor porcentaje de células vivas al final del montaje experimental. La configuración experimental se presenta en la Fig. 8D. Antes de iniciar se verificó que la temperatura de salida del sistema se encontrara en $37\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ y que no hubiera burbujas en el sistema, pues pueden comprometer la viabilidad celular al generar embolias gaseosas en la circulación coronaria.

Una vez el corazón esté montado al sistema Langendorff se realizó un lavado durante 5 minutos con solución Tyrode 0 Ca^{2+} sin recircular la solución, con el objetivo de limpiar al máximo los restos de sangre que pudiesen quedar en las cámaras cardiacas. Posteriormente se perfundió el corazón durante 20 minutos recirculando 10 ml de una solución de Tyrode 0 Ca^{2+} con 1 mg/ml de colagenasa tipo II y 0.1 mg/ml de Proteasa XIV. Una vez terminado este tiempo se cambió nuevamente a solución Tyrode 0 Ca^{2+} y se realizó un nuevo lavado durante 5 minutos más sin permitir que la solución recirculara. Al finalizar, se obtuvo un corazón con una consistencia blanda y elástica, y fue retirado del sistema Langendorff. Se removieron las aurículas con tijeras dejando sólo los ventrículos, los cuales se cortaron a la mitad y cada una se suspendió en una caja de Petri mediana con 7.5 ml de solución Tyrode 0 Ca^{2+} previamente calentada en el baño de temperatura controlada. Cada mitad se disoció con pinzas en la solución y se esperó aproximadamente 5 minutos a que las células cayeran al fondo de la caja de Petri para luego ser observadas en el microscopio.

Finalmente se realizó la inspección visual de las células para verificar la morfología e integridad de las membranas celulares. Una célula viable presenta las estriaciones típicas del musculo cardiaco, membrana birrefringente, sin presencia de vacuolaciones. Al contrario, al morir las células colapsan sobre sí mismas formando “esferas oscuras”. El uso de Tyrode 0 Ca^{2+} es esencial para detener el ciclo cardiaco y obtener mayor porcentaje de viabilidad celular, pero su posterior reincorporación es indispensable para garantizar la supervivencia de los cardiomiocitos posterior a la disociación y la obtención de gigasellos duraderos en los experimentos de *patch-clamp* (Suchyna, Markin, & Sachs, 2009). La reincorporación de Ca^{2+} se hizo a partir de una segunda solución preparada

con Agua Milli-Q con 1 M CaCl₂. Se agregaron de manera sucesiva 1, 2, 3, 4 y 5 µL a la solución con células, en intervalos de 5 minutos entre cada uno de ellos. De esta manera se logra una concentración final de 1 mM Ca²⁺ de la solución Tyrode. Un aumento abrupto de la concentración de Ca²⁺ genera hipercontractilidad y muerte celular, por lo que este proceso debe ser lento y de manera progresiva (Ackers-johnson & Foo, 2019).

6.4.2 Aislamiento de neuronas

Las neuronas provenientes de DRG fueron obtenidas por disociación enzimática, el protocolo presentado aquí fue realizado desde la modificación de otros autores (Bradley Zuchero, 2014; Lin & Chen, 2018; Roy & Narahashi, 1994). Posterior al sacrificio del animal por dislocación cervical, la piel fue removida de craneal a caudal, se realizó un corte longitudinal en la región abdominal y se removieron las vísceras. Se realizan dos cortes longitudinales a ambos lados de la columna vertebral y un corte transversal al inicio de la región lumbosacra (L6). De esta manera logramos aislar la columna desde la región cervical (C2) hasta la lumbar (Fig. 9A). Con tijeras se removieron los músculos longissimus que se encuentran unidos a la región dorsal de la columna. Se realizaron dos cortes transversales de la columna: C6-T1 y T13-L1, utilizando el inicio y final de la parrilla costal como referencia. De esta manera obtuvimos tres porciones de columna (cervical, torácica y lumbar) (Fig. 9B), las cuales se conservaron en Tyrode 0 Ca²⁺ fría. Tomamos la región cervical (C2-C6) y con tijeras (WP22202B, WPI, USA) siguiendo el canal vertebral se realizó un corte sagital de la región dorsal de la columna, luego realizamos el mismo corte en la región ventral, de esta manera quedamos con dos porciones sagitales de la columna cervical (derecha e izquierda). Se retiró la médula espinal, exponiendo los ganglios asociados a cada cuerpo vertebral (Fig. 9C). Antes de

proceder a extraer los ganglios fue necesario remover con cuidado las meninges; si se realiza excesiva tracción se corre el riesgo que todos los ganglios queden unidos a esta membrana. Una vez removida, se extrajeron uno a uno los ganglios y se agregaron a un beaker previamente preparado con 2 ml de solución Tyrode 0 Ca^{2+} en refrigeración (Fig. 9C-D). Este proceso se repitió para las porciones torácica y lumbar. Cabe resaltar que el grosor de las meninges es menor en estas últimas dos porciones, por lo que se pueden remover más fácilmente. En la región lumbar comienza a notarse cómo disminuye el diámetro del canal vertebral. Con esta técnica se obtuvieron de cada ratón entre 35-40 ganglios aproximadamente.

6.4.2.1 Disociación enzimática: una vez extraídos los ganglios, se diluyeron 10 mg de Colagenasa tipo II en 1 ml de Tyrode 0 Ca^{2+} en tubo Falcon de 15 ml y posteriormente se adicionaron los 2 ml de Tyrode 0 Ca^{2+} en donde se encontraban los ganglios para una concentración final de enzima de 3.3 mg/ml. Esta solución se incubó por 60 minutos en baño de temperatura controlada (Memmert, Alemania) a 37.5°C con agitación leve (Fig. 9E). Una vez pasado este tiempo, se procedió a realizar el lavado de las enzimas, en un procedimiento que consistió en ir reemplazando lenta y repetidamente 2 ml de solución por 2 ml de solución Tyrode 0 Ca^{2+} para no generar turbulencia en los ganglios; esta solución estaba precalentada a la misma temperatura que la solución con enzimas. Posteriormente los ganglios se incubaron en 3 ml de solución Tyrode 0 Ca^{2+} con Tripsina 2.5 mg/ml, a 37.5°C en baño de temperatura controlada por 12 minutos. Las enzimas se retiraron repitiendo el proceso de lavado descrito arriba. La disociación mecánica de los ganglios se realizó mediante succión lenta y repetida (~15 veces) con ayuda de una

pipeta de vidrio pulida al fuego de diámetro externo de 0.1 mm, sin permitir el ingreso de burbujas.

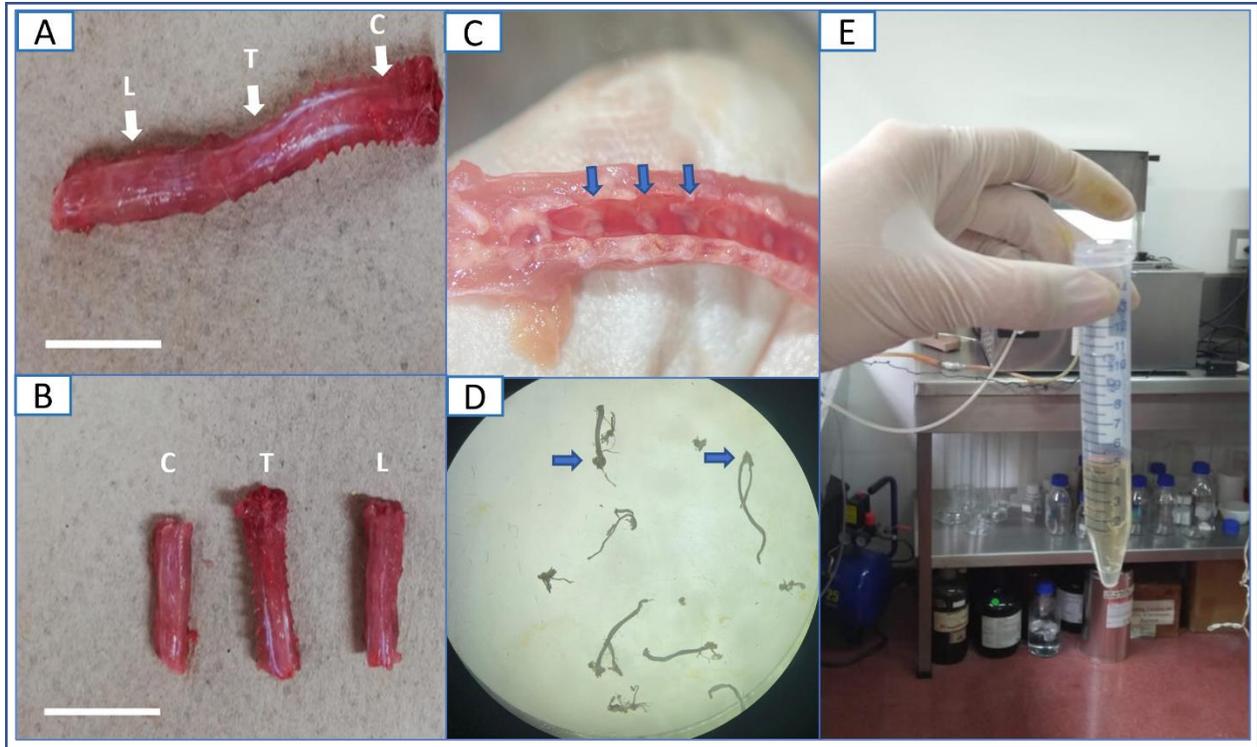


Figura 9. Aislamiento de neuronas del DRG. **A.** Columna vertebral de ratón, señaladas con flecha blanca la región cervical (C), torácica (T), lumbar (L) **B.** Porciones de columna vertebral de ratón **C.** Corte axial de columna cervical de ratón, las flechas azules señalan los DRG. **D.** Ganglios (flechas azules) en suspensión Tyrode 0 Ca^{2+} vistos bajo el estereomicroscopio. **E.** Ganglios en solución con colagenasa previos a ser puestos en el baño de temperatura controlada. Barra de calibración 2 cm.

Se obtuvo una solución turbia, que fue centrifugada a 800 rpm (Labofuge, Heraeus Sepatech, Alemania) por 1 minuto a temperatura ambiente. Luego se extrajo 1 ml del sobrenadante y se reservó en un tubo Falcon. El pellet se resuspendió, se agitó nuevamente con 8 ciclos suaves de succión y se recentrifugó bajo las mismas condiciones. Se tomaron 2 ml de sobrenadante y se mezclaron con el primer mililitro que

había sido reservado, para obtener un total de 3 ml de solución Tyrode 0 Ca^{2+} a temperatura ambiente con neuronas resuspendidas.

6.4.2.2 Inmunofluorescencia de las neuronas del DRG: una vez dissociadas, se tomaron 400 μL de la solución con neuronas y se pusieron por 30 min sobre placas electrocargadas (HDAS001A, HUIDA Medical Instruments, China) para promover su adhesión al fondo. Los bordes de la solución con las células se rodearon con un marcador hidrófobo para delimitarlos. Luego se realizaron 3 lavados, eliminando 150 μL de solución sobre la placa y adicionando 150 μL de solución de lavado. Posteriormente se adicionaron 200 μL de paraformaldehído al 1% durante 25 minutos. Se repitieron los lavados y luego se adicionó solución de permeabilización por 30 minutos. Después de nuevos lavados, se adicionó solución de bloqueo por 45 minutos. El lavado final se realizó con PBS y se adicionaron 200 μL de una mezcla de los anticuerpos primarios Tuj-1 (4.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y NF-200 (1:1000), los cuales se incubaron a temperatura ambiente y luego en refrigeración ($\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 12 horas. Transcurrido este tiempo, se realizaron 3 lavados con PBS y se adicionaron 200 μL de solución de bloqueo modificada con una mezcla de AlexaFluor 488 Goat anti-mouse (1:1000) y AlexaFluor 594 Goat anti-rabbit (1:1000) por 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, se realizaron 3 lavados con solución PBS y se aplicaron 50 μL de solución de bloqueo modificado con Hoechst (Thermo Fisher, USA) por 15 minutos, después de lo cual se eliminó la solución y se aplicaron 20 μL del medio de montaje Mowiol (81381, SIGMA) sobre la placa, se cubrió con lámina cubreobjetos y se dejó secar por al menos 2 horas antes de ser observada al microscopio.

6.4.2.3 Viabilidad celular de las neuronas del DRG: con el objetivo de evaluar la viabilidad celular de las neuronas al terminar la disociación, se realizaron experimentos con Mag-Fluo-4. Este colorante es un indicador de Ca^{2+} de baja afinidad, análogo de Fluo-4, capaz de detectar niveles intracelulares de Ca^{2+} entre 1 μM a 1 mM en diferentes tipos de células excitables (Milán et al., 2021). Esto lo convierte en un indicador ideal para detectar concentraciones de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico y en neuronas. Neuronas viables contienen niveles bajos de Ca^{2+} intracelular, mientras que células deterioradas o muertas pierden la integridad de su membrana, por lo que parte del colorante citosólico escapa de la célula y el restante queda compartimentalizado en el retículo endoplásmico (Kasatkina, 2016). En estos experimentos se utilizó Mag-Fluo-4 en su forma AM, que es permeable a la membrana celular. Los experimentos se realizaron con células cargadas durante 15 minutos en solución Tyrode 0 Ca^{2+} con Mag-Fluo-4 a una concentración de 10 μM , a temperatura ambiente, en cuarto oscuro.

6.4.2.4 Visualización de experimentos en campo claro y fluorescencia: la visualización de preparaciones en campo claro o fluorescencia se realizó utilizando un microscopio de fluorescencia invertido (Axio Observer A1, Carl Zeiss), acoplado a una cámara (AxioCam ERc 5s, Carl Zeiss), utilizando los filtros adecuados (575-600/605/612-682 nm y 450–490/510/515 nm (excitación/dicroico/emisión), Carl Zeiss). El postprocesamiento y la calibración de las imágenes se hizo con ayuda del programa ImageJ v 1.52a (NIH, USA).

6.4.3 Preparación de micropipetas

Para asegurar la obtención de gigasellos se fabricaron micropipetas con un diámetro interno entre 0.5-1 μm y resistencia en el baño entre 1.6-2.6 $\text{M}\Omega$ (Hamill, Marty, Neher, Sakmann, & Sigworth, 1981b), a partir de capilares de borosilicato (593800, AM-

Systems, USA). El proceso de fabricación de las micropipetas se realizó con el *micropuller* (Pul-100, WPI) siguiendo el protocolo que se presenta en la Fig. 10A. Posteriormente se realizó el proceso de pulido, el cual consiste en aproximar la punta de la micropipeta a una fuente de calor para eliminar bordes filosos que puedan quedar en las micropipetas posterior al halado (*pulling*). Utilizando una microforja (MF 200-1, WPI) y un microscopio convencional, se ubicó la pipeta en el campo del microscopio a 50 μm del filamento ya que este se expande al calentarse y de esta manera se evita que entre en contacto directo con la micropipeta. La perilla de la microforja se posicionó en 60 y se efectuaron 10 pulsos de calor de aproximadamente 1 segundo de duración (Fig. 10B).



Figura 10. Preparación de micropipetas. **A.** Protocolo para el fundido de capilares utilizado en Pul-100, WPI. **B.** Vista en microscopio de luz de micropipeta y filamento de microforja durante el proceso de fundido. La flecha color azul señala el filamento que es calentado por la microforja, la flecha amarilla señala la micropipeta ubicada a 50 μm del filamento.

6.4.4 Patch-clamp

El *setup* de la técnica incluyó: un digitalizador (Digidata 1550A, Molecular Devices, USA), un amplificador (Multiclamp 700B, Molecular Devices), *Headstage* (CV-7B, Molecular Devices), micromanipulador digital (MS-314, Marzhauser Wetzlar, Alemania),

microscopio invertido (Axio Observer A1, Carl Zeiss), cámara digital (AxioCam ERc 5s, Carl Zeiss), cámara experimental (RC-26g, Warner Instruments, USA), mesa antivibratoria y jaula de Faraday (TMC AMETEK, Valley Research, USA) y un sistema de presión hidrostática (Fig. 11).

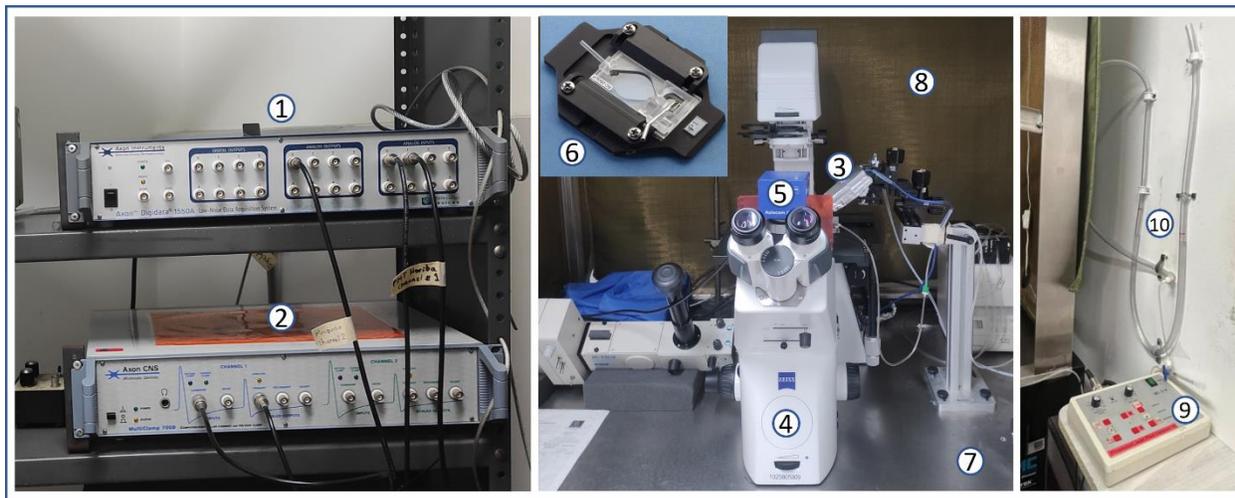


Figura 11. Setup de patch-clamp. 1. Digitalizador. 2. Amplificador. 3. Headstage. 4. Microscopio invertido. 5. Cámara digital. 6. Cámara experimental. 7. Mesa antivibratoria. 8. Jaula de Faraday. 9. Micromanipulador digital. 10. Sistema de presión hidrostática.

Para el registro y análisis de las corrientes iónicas se utilizaron los programas Multiclamp 700B y pClamp v10.05 (Clampex, Clampfit, Molecular Devices). Se utilizó el programa de adquisición Clampex con un holding en 0 mV y una frecuencia de adquisición de 10 kHz.

Una vez las células estuvieron sobre la cámara experimental se seleccionaron aquellas con forma rectangular, la membrana íntegra y que no presentaran contracción espontánea (Fig. 12A). Antes de iniciar, la interfaz de Clampex se encontraba en modo *Bath* (Fig. 12B). Se realizó el llenado de la micropipeta con la solución interna previamente filtrada (Millipore, Alemania), posteriormente se posicionó en el *holder* del

headstage y usando el micromanipulador se sumergió en la solución, para medir su resistencia en el baño (R_b). Se aceptaron resistencias entre 1.3-2.6 M Ω , pues garantizaron que dichas micropipetas tuvieran una punta del diámetro adecuado y que no estuvieran obstruidas por algún tipo de material particulado, requisito fundamental para la obtención de gigasellos. Posteriormente se abordó la célula utilizando el micromanipulador; una vez la micropipeta tocó la membrana se verificó que la resistencia comenzara a aumentar y la amplitud de los pulsos cuadrados comenzara a disminuir, lo cual es esperable según la Ley de Ohm, según la cual mayor resistencia menor la amplitud del pulso. Cuando disminuyó a 1/2 de la amplitud inicial se aplicaron 10 ml presión negativa con una jeringa de 10 ó 20 ml través del sistema de presión hidrostática, el cual garantizó una presión negativa constante independiente del volumen de aire extraído del sistema. Cuando la obtención del gigasello resultó exitosa, la resistencia tomó valores en el orden de los gigaohmios (G Ω) y por ende, la amplitud de los pulsos fue cercana a los 0 V; en este punto se dice que se ha formado un gigasello y se ha alcanzado la configuración *cell attached*. Posteriormente, en la interfaz de Clampex se pasó a modo *Patch* (Fig. 12C) y se procedió a romper la membrana. Para ello se realizó una presión negativa correspondiente a un volumen de 0.2 ml con una jeringa de 1 ml a través de una llave de 3 vías conectada al sistema de presión hidrostática, la presión se aplicó de manera rápida. Al romper la membrana sin perder el gigasello fue evidente la aparición de picos capacitivos, lo cual indica que se ha logrado la configuración *whole-cell*.

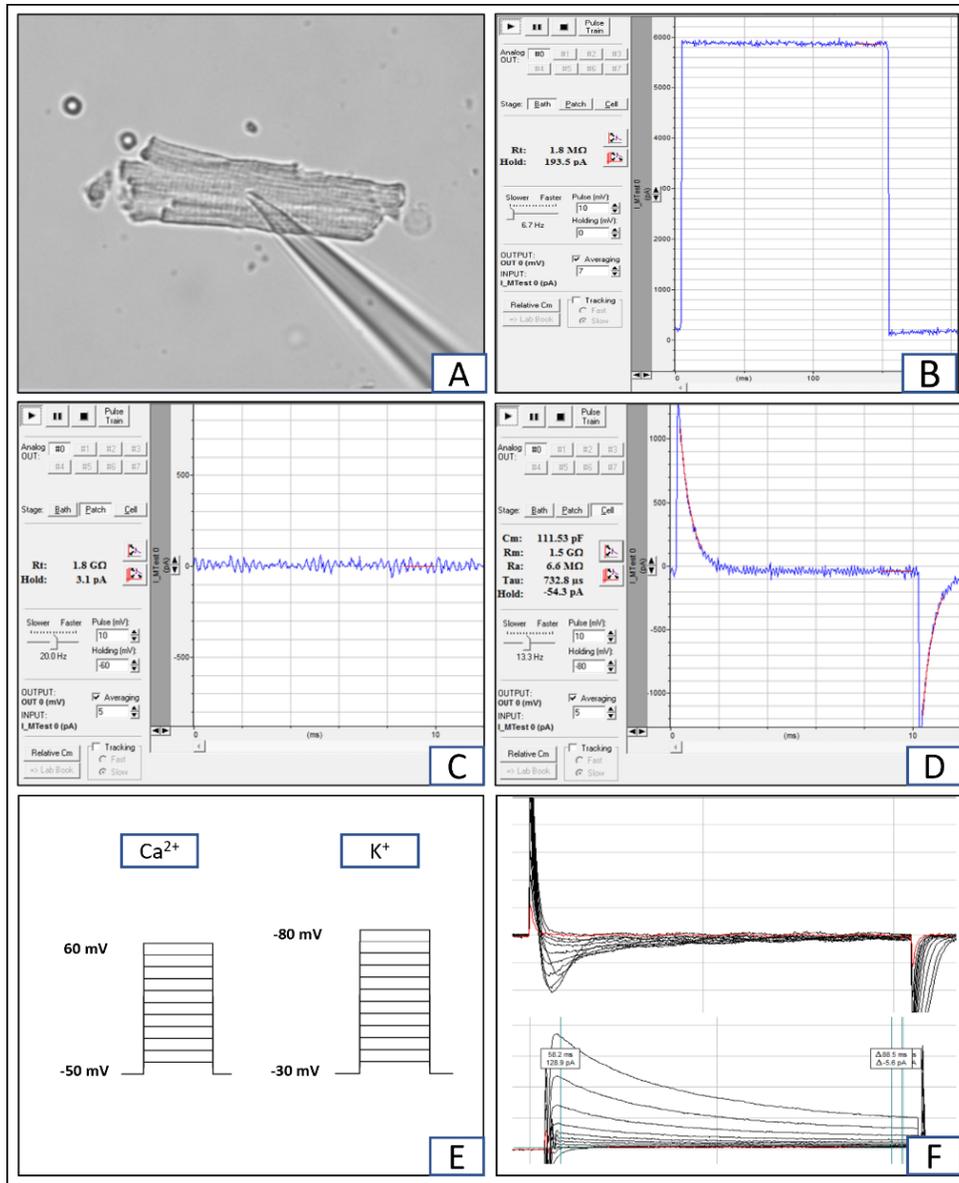


Figura 12. Técnica de *patch-clamp* para la obtención de corrientes iónicas. **A.** Cardiomiocito viable durante experimento de *patch-clamp*. **B.** Interfaz de Clampex v10.05 en modo *Bath*, en donde se observan los pulsos cuadrados y es posible medir la resistencia de micropipeta en el baño ($R_t=1.8\text{ M}\Omega$). **C.** Interfaz de Clampex v10.05 en modo *Patch*, cuando se ha logrado el gigasello ($R_t=1.8\text{ G}\Omega$). **D.** Interfaz de Clampex v10.05 en modo *Cell*, se observan picos capacitivos que indican la ruptura de la membrana, en este modo es posible observar las propiedades eléctricas de la célula. **E.** Esquema de los protocolos utilizados para evaluar la dependencia del voltaje de las I_{CaL} (izquierda) e I_K (derecha). **F.** I_K y curva $I-V$ en interfaz de Clampfit.

Finalmente, desde la interfaz de Clampex se pasó a modo *Cell* (Fig. 12D), el cual permitió observar las propiedades eléctricas celulares como: la capacitancia de la membrana (C_m), resistencia de acceso (R_a), resistencia de la membrana (R_m) y constante de tiempo de carga/descarga del capacitor celular (τ).

Desde la interfaz de Multiclamp 700B se removieron los picos capacitivos con la casilla *whole-cell*, además se compensó la resistencia en serie generada entre la pipeta y el amplificador seleccionando la casilla *Rs compensation* (50-60% fue suficiente). *Leak subtraction* se seleccionó sólo cuando R_m disminuyó a valores de $M\Omega$ al seleccionar las casillas mencionadas previamente.

Al llegar a este momento se aplicaron los protocolos para medición de corrientes iónicas. Para la evaluación de la dependencia del voltaje de las I_{CaL} el protocolo utilizado consistió en 11 pulsos, con pasos de 10 mV y 100 ms de duración, desde un holding de -50 mV hasta +60 mV. Para I_K el protocolo utilizado consistió en 12 pulsos, con pasos de 10 mV y 100 ms de duración, desde un holding de -30 mV hasta +80 mV. (Fig. 12E).

De forma preliminar las corrientes obtenidas fueron procesadas en Clampfit, en donde se realizó su respectiva curva I-V (Fig. 12F), se evaluó la calidad de cada corriente teniendo en cuenta su amplitud, la presencia de ruido y el potencial al cual se abren y se cierran los Ca_v y K_v según lo reportado por la literatura.

6.4.4.1 Evaluación de péptidos sobre I_{CaL} e I_K en cardiomiocitos de ratón: a partir del análisis bioinformático del transcriptoma de la glándula venenosa de *P. verdolaga* se seleccionaron 180 secuencias con posible efecto antimicrobiano, de las cuales 16 de estas mostraron efecto antibacteriano. A partir de estas, se seleccionaron 5 con

estructura DBP y una con estructura NDBP, esta última, seleccionada por su potente efecto antibacteriano. De esta manera fueron escogidos 6 péptidos para realizar un tamizaje inicial sobre I_{CaL} e I_K . Los péptidos fueron suministrados liofilizados por el grupo Malaria de la Universidad de Antioquia. En nuestro laboratorio fueron resuspendidos en agua ultrapura y congelados a -20°C en alícuotas. El día del experimento fueron descongelados, pero se mantuvieron fríos en una cava con hielo hasta su uso. Se evaluaron a una concentración final de $1\ \mu\text{M}$ disueltos en la solución externa sobre ambos tipos de corrientes de cardiomiocitos, a temperatura ambiente.

6.5 Análisis estadístico

El análisis de datos y las gráficas fueron realizados con Clampfit v10.05 y Origin Pro 2019. Los datos de las corrientes control de I_{CaL} e I_K y los experimentos con los péptidos son presentados como promedio \pm error estándar (SEM). Las corrientes control fueron normalizadas con respecto a la capacitancia de la membrana (pA/pF). Las corrientes obtenidas antes y después de la aplicación de péptidos fueron normalizadas con respecto a la amplitud pico control (I/I_{max}) previo a su presentación en curvas I-V.

La constante de inactivación τ de I_{CaL} se estimó a partir de un ajuste exponencial decreciente según la ecuación:

$$Y = Y_0 + Ae^{-((x-x_0)/\tau)}$$

Donde A (pA) es la amplitud máxima del registro, Y el valor de la amplitud de la corriente (pA) y x el tiempo medido en milisegundos (ms).

7. Resultados

7.1 Aislamiento exitoso de cardiomiocitos y neuronas del DRG

7.1.1 Cardiomiocitos

Utilizando el sistema de perfusión inverso Langendorff se logró estandarizar de manera exitosa el aislamiento de cardiomiocitos de ratón. Con este método se obtienen de manera reproducible un 70-80% de células viables (Fig.13A), con características morfológicas (Fig.13B) típicas para esta población celular.

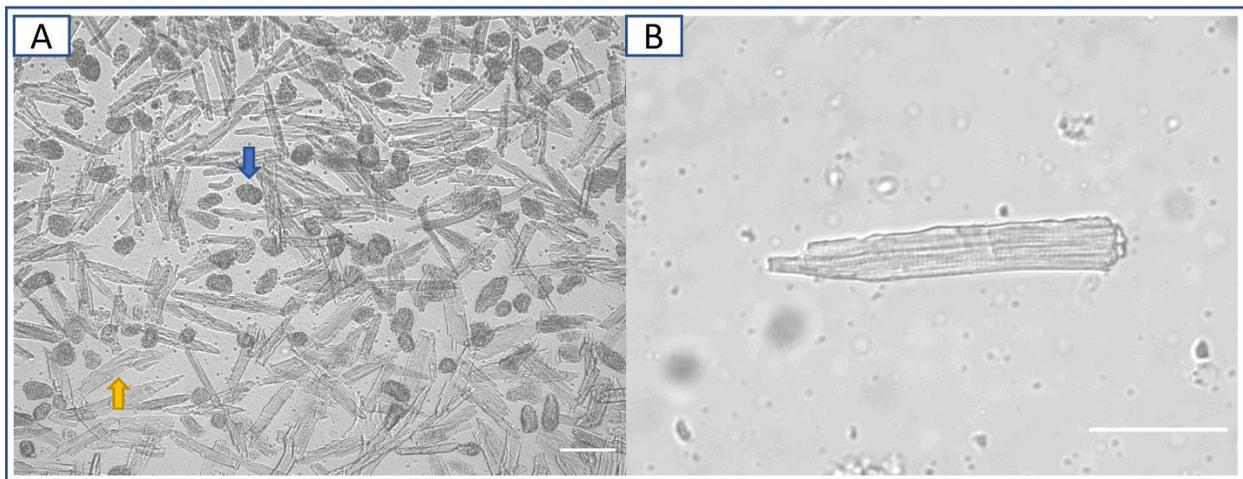


Figura 13. Resultado de aislamiento de cardiomiocitos con sistema de perfusión inversa Langendorff. **A.** Imagen en campo claro de cardiomiocitos en solución de Tyrode con Ca^{2+} posterior al aislamiento (Aumento 10X). La flecha color azul señala una célula muerta colapsada sobre sí misma, la flecha color amarillo señala un cardiomiocito viable con las características deseadas. **B.** Cardiomiocito alargado, con membrana íntegra y brillante, con patrón de estriaciones transversales y sin vacuolaciones (Aumento 20X). Barra de calibración para ambos paneles: 50 μm .

7.1.2 Neuronas del DRG

Se logró estandarizar el aislamiento de neuronas del DRG de ratón por medio de disociación enzimática con colagenasa II y Tripsina. Las células obtenidas fueron sometidas a experimentos de inmunofluorescencia indirecta en los cuales se observó la

marcación citoplasmática con los anticuerpos anti β -III-tubulina y NF-200. Los resultados confirman la identificación precisa de neuronas del DRG. Además, el colorante Hoechst identificó un núcleo central, redondeado, en cada célula (Fig. 14).

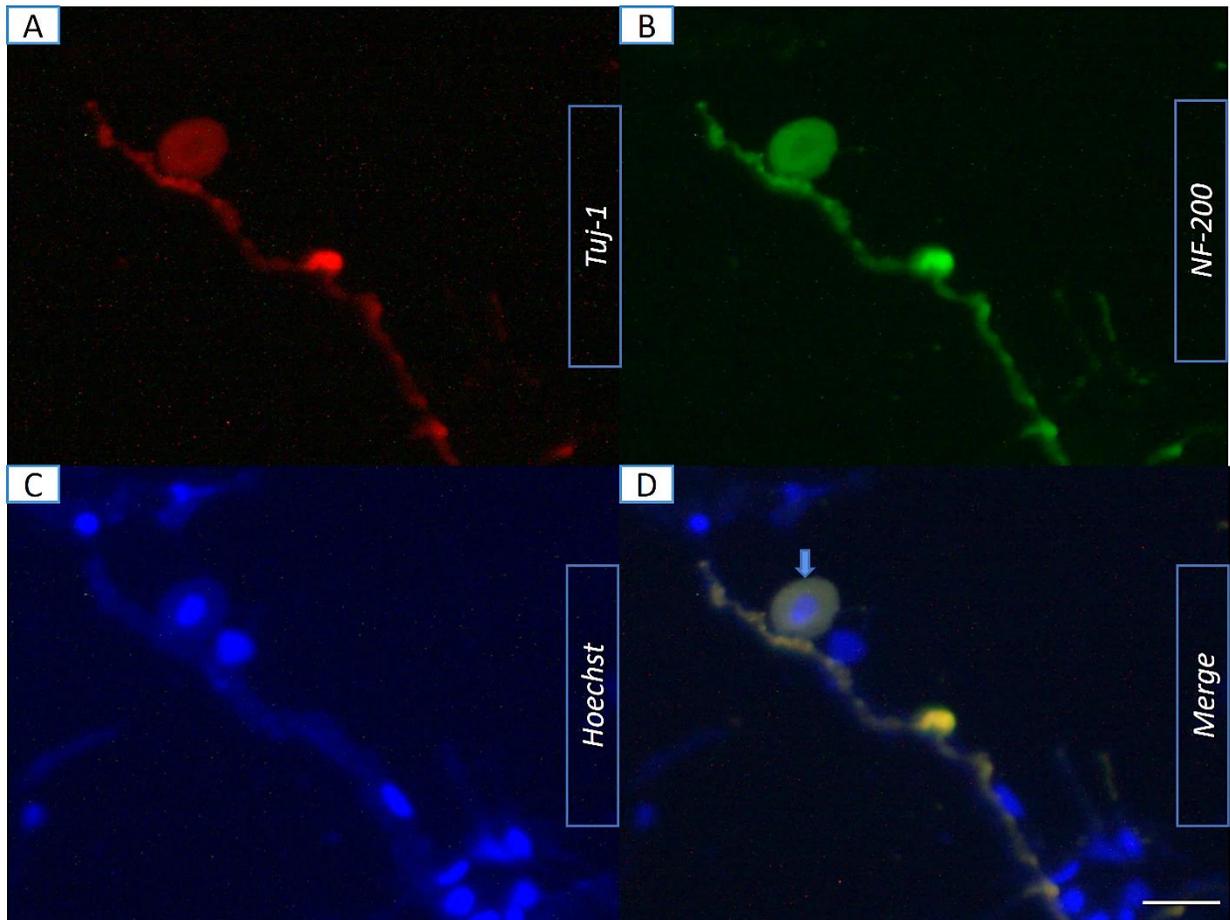


Figura 14. Inmunomarcaje en neuronas del DRG. **A.** Neurona positiva para el anticuerpo primario Tuj-1 contra β -III-tubulina, y revelada con un anticuerpo secundario acoplado a Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit. **B.** La misma neurona mostrada en A también es positiva para el anticuerpo primario NF-200 contra los neurofilamentos, revelada con un anticuerpo secundario acoplado a Alexa Fluor 488 goat anti-mouse. **C.** Marcaje de núcleos con Hoechst. **D.** Merge del marcaje Tuj-1, NF-200 y Hoechst. El soma y axón positivos (flecha azul) para el triple marcaje corresponden a una neurona, mientras que los demás núcleos corresponden a células de la glía. Barra de calibración para todos los paneles: 30 μ m. Vista en 20X. Este resultado es representativo de n=3.

La viabilidad celular se confirmó por medio del indicador fluorescente de Ca^{2+} Mag-Fluo 4, el cual permitió diferenciar células vivas de células degeneradas o en proceso de

muerte. Las células vivas permiten el ingreso del colorante en su forma AM, favoreciendo su desesterificación y acumulación principalmente en el citoplasma, generando una distribución homogénea de la fluorescencia verde, como se observa en la Fig. 15A. Las células en proceso de muerte o muertas dejan escapar el colorante a través de la membrana plasmática externa, pero lo compartimentalizan en el núcleo y la periferia nuclear (retículo endoplásmico) (Fig. 15B).

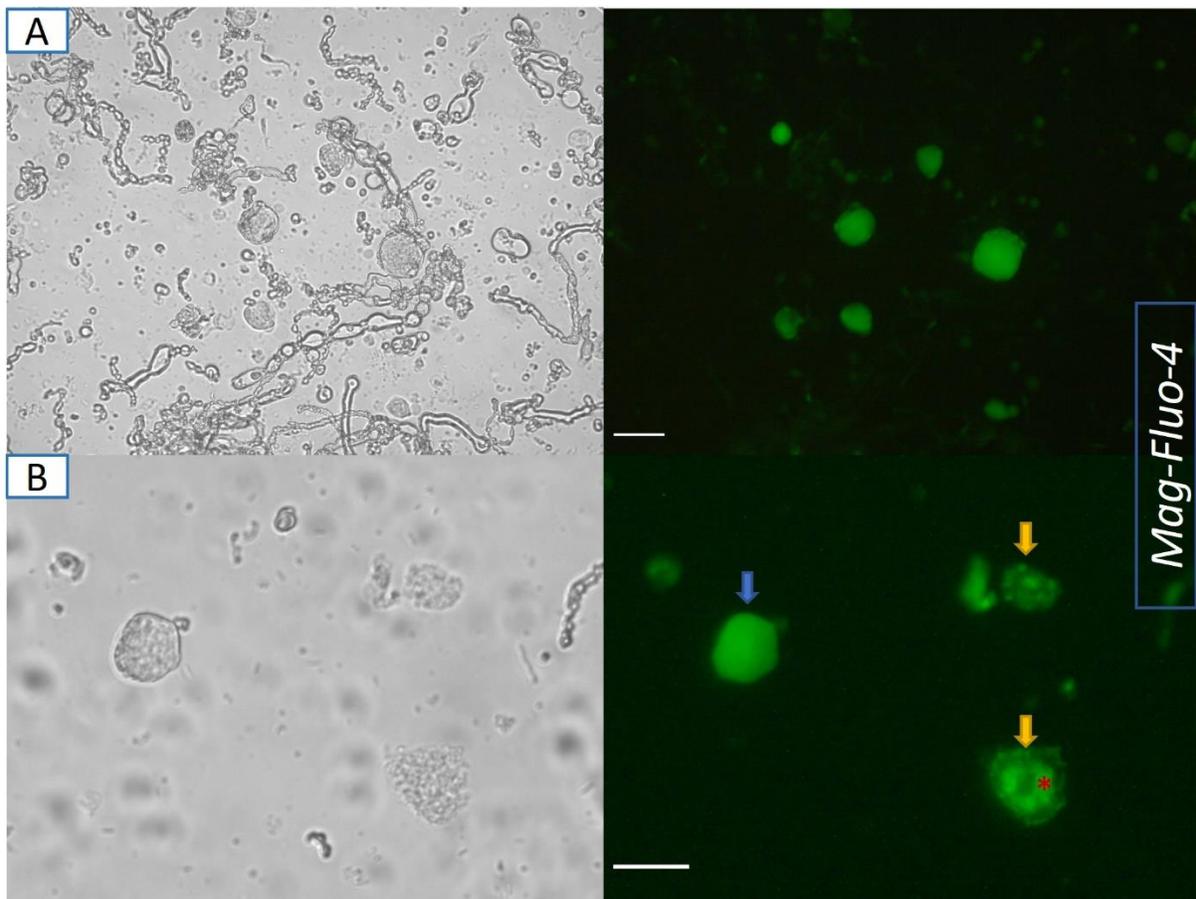


Figura 15. Experimentos de viabilidad celular en neuronas del DRG cargadas con Mag-Fluo-4. **A.** Imágenes de campo claro (izquierda) y de fluorescencia (derecha) de neuronas posterior a disociación enzimática suspendidas en solución Tyrode 0 Ca^{2+} y cargadas con Mag-Fluo-4. Se observa una intensidad de fluorescencia homogénea en el citoplasma de las células, que refleja concentraciones de Ca^{2+} citosólico basales, indicativo de neuronas vivas. **B.** Se observa una neurona viable (flecha azul) y algunas muertas (flechas amarillas). La primera tiene una distribución citosólica homogénea de la fluorescencia, mientras la segunda muestra un claro aumento de la fluorescencia perinuclear (asterisco rojo), y regiones sin fluorescencia citosólica, que reflejan la compartimentalización del Ca^{2+} y la ruptura de la membrana celular. Barra de calibración 30 μm . Este resultado es representativo de $n=3$.

7.2 Registro satisfactorio de I_{CaL} e I_K en cardiomiocitos de ratón

Se obtuvieron I_{Ca} e I_K mediante *patch-clamp* en modo *voltage-clamp* y configuración *whole-cell* en cardiomiocitos de ratón. La Fig. 16 muestra un análisis descriptivo de R_b y C_m de una submuestra de 74 experimentos en donde se obtuvo exitosamente la configuración *whole-cell*. La R_b de las micropipetas osciló entre 1.3-2.8 $M\Omega$, sin embargo, el mayor porcentaje de *whole-cell* se obtuvo entre 1.6-2.2 $M\Omega$ (Fig. 16A), por esta razón se determinó este como el rango ideal de R_b para nuestros experimentos en cardiomiocitos. Las C_m variaron entre 80-240 pF pero la mayoría se encontraron entre 110-160 pF (Fig. 16B). Cabe resaltar que células muy pequeñas (<100 pF) tendieron a ser más inestables, con *whole-cell* menos duraderos y morir más fácilmente que otras de tamaño mediano. Las resistencias del sello en *whole-cell* se mantuvieron consistentemente entre 1-4 $G\Omega$.

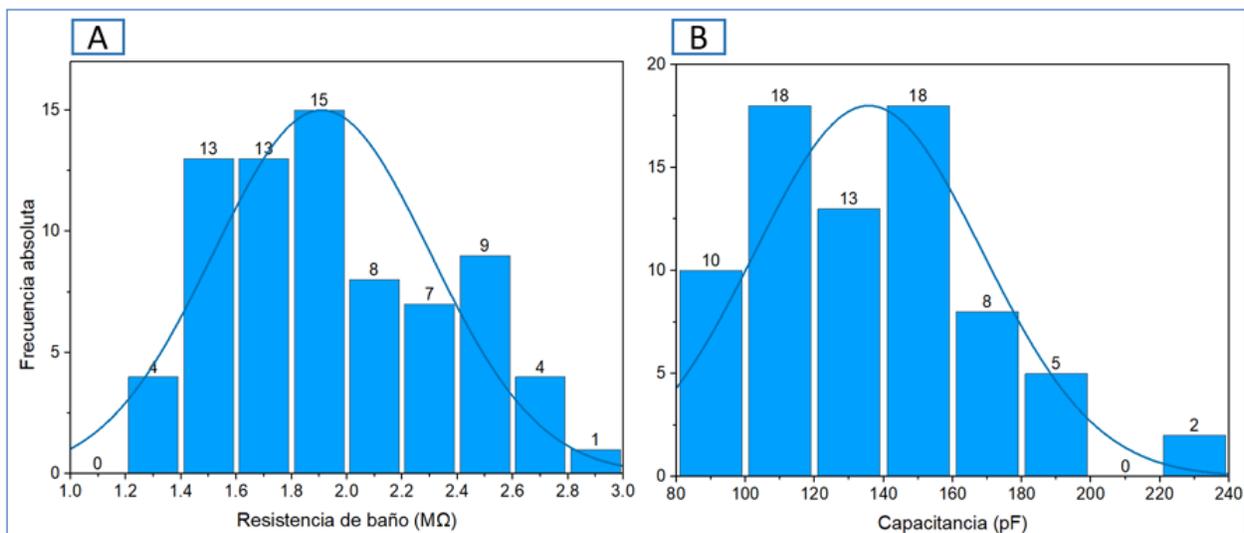


Figura 16. Resistencia de micropipetas en el baño y capacitancia de membrana en cardiomiocitos de ratón. A. Distribución de R_b de micropipetas en experimentos donde fue exitosa la obtención de la configuración *whole-cell* ($Q1=1.6 M\Omega$; $Q3=2.2 M\Omega$; $n=74$). **B.** Distribución de C_m . Promedio 135.7 ± 32.9 ($n=74$).

Las I_{Ca} obtenidas presentaron la cinética típica para esta población celular, con una activación en menos de 10 ms, y una inactivación un poco más lenta con una constante de inactivación $\tau=23.9\pm 2.40$ ms calculada para un $n=7$.

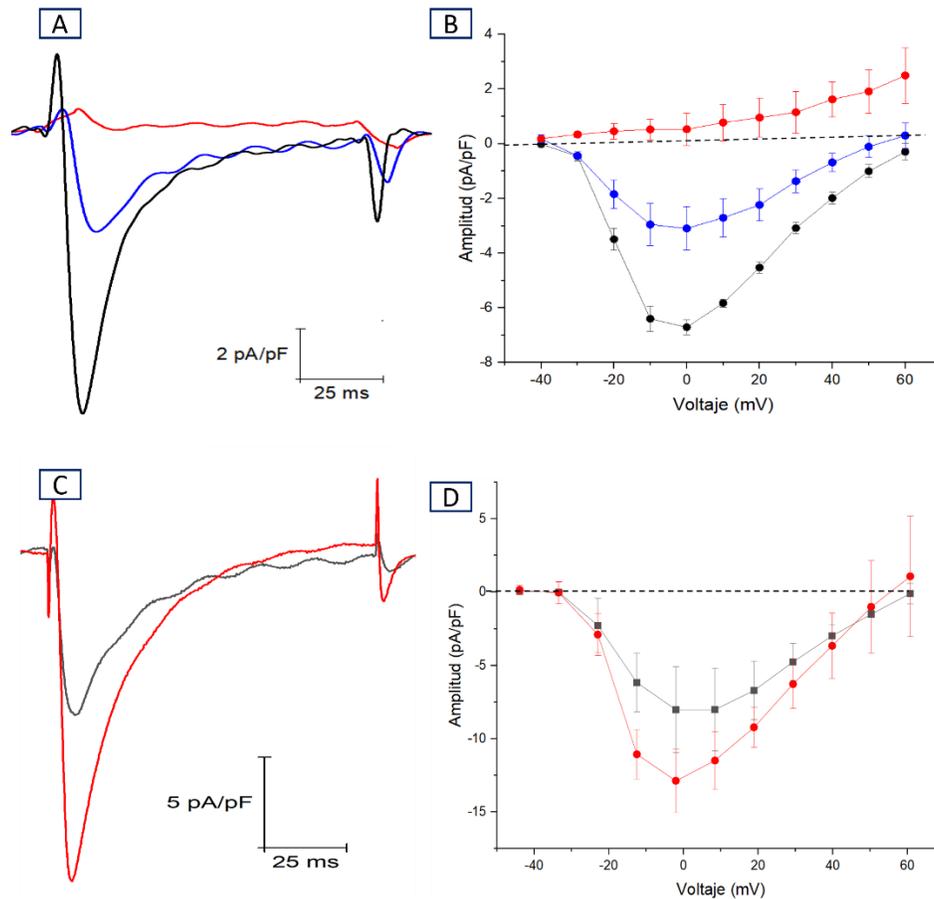


Figura 17. I_{CaL} en cardiomiocitos de ratón. A. Corriente I_{CaL} vs tiempo (IT) en un cardiomiocito antes y después de la aplicación de nifedipina. Se observa la amplitud máxima alcanzada a un voltaje de 0 mV en presencia y ausencia de nifedipina, normalizada por la capacitancia celular (pA/pF). La amplitud normalizada control a un potencial de 0 mV fue -7.43 ± 1.10 pA/pF ($n=8$). Corriente control sin nifedipina (negro), con nifedipina 5 μ M (azul), y nifedipina 13 μ M (rojo), representativa de $n=4$. **B.** Curva corriente vs voltaje (I-V) de I_{CaL} en cardiomiocitos ($n=4$). En condiciones control (negro) se observa que la corriente inició entre -40 y -30 mV y alcanzó su máxima amplitud a 0 mV. El potencial de reversión está cercano a +60 mV. La reducción de la I_{CaL} bajo el efecto de nifedipina (azul y rojo) es evidente. Protocolo -40 a +60 mV, con aumentos de +10 mV. **C.** Curva IT de I_{CaL} en cardiomiocito en ausencia y presencia del agonista isoproterenol, normalizada por la capacitancia celular (pA/pF). Corriente control sin isoproterenol (negro) y con isoproterenol 100 μ M (rojo), representativa de $n=4$. Se observa un aumento de la corriente pico a 0 mV de $60.71\pm 1.10\%$ ($n=4$) inducido por isoproterenol. **D.** Corriente I_{CaL} vs tiempo (IT) en un cardiomiocito antes (negro) y después de la aplicación de isoproterenol (rojo) ($n=4$). Las I_{CaL} fueron normalizadas usando la capacitancia de la membrana celular (pA/pF).

Las I_{Ca} fueron inhibidas parcialmente por el antagonista de Ca^{2+} nifedipina a una concentración de $5 \mu M$ y completamente a $13 \mu M$ (Fig. 17A-B). Las I_{Ca} también fueron potenciadas por el agonista β -adrenérgico isoproterenol, a $100 \mu M$ (Fig. 17C-D). Todas estas características confirman que trabajamos específicamente con I_{CaL} .

Las I_K fueron inhibidas parcialmente por el antagonista no selectivo de canales de K^+ TEA a una concentración de $150 mM$ (Fig. 18). La corriente no es inhibida completamente porque TEA posee efecto sobre I_{to} , I_{Kur} e I_{Ks} , pero no sobre I_{Kr} (Kurokawa et al., 2001; Oudit & Backx, 2017; Oudit et al., 2001).

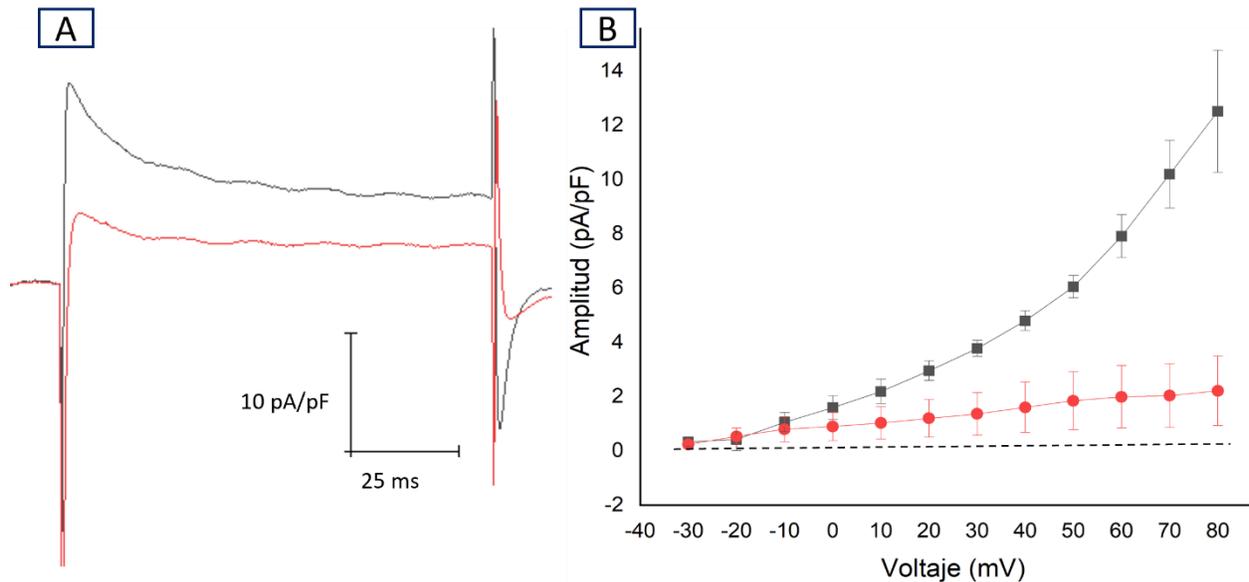


Figura 18. I_K en cardiomiocitos de ratón. **A.** Corriente I_K vs tiempo (IT) en cardiomiocito. En la gráfica se observa la amplitud máxima alcanzada a un voltaje de $+80 mV$ en condición control (negro) y en presencia de TEA $150 mM$ (rojo), representativa de $n=3$. La amplitud normalizada control a un potencial de $+80 mV$ fue de $12.50 \pm 2.25 pA/pF$ ($n=4$). **B.** Curva I-V de K^+ en cardiomiocito ($n=3$). En el control (negro) la corriente se inicia cuando el potencial de membrana alcanza un valor de $-20 mV$. El efecto del TEA es notorio (rojo). Protocolo -30 a $+80 mV$, con incrementos de $+10 mV$. Las I_K fueron normalizadas usando la capacitancia de la membrana celular (pA/pF).

La respuesta de las diferentes corrientes a sus antagonistas nos garantiza que las corrientes obtenidas corresponden a I_{CaL} e I_K en cardiomiocitos de ratón.

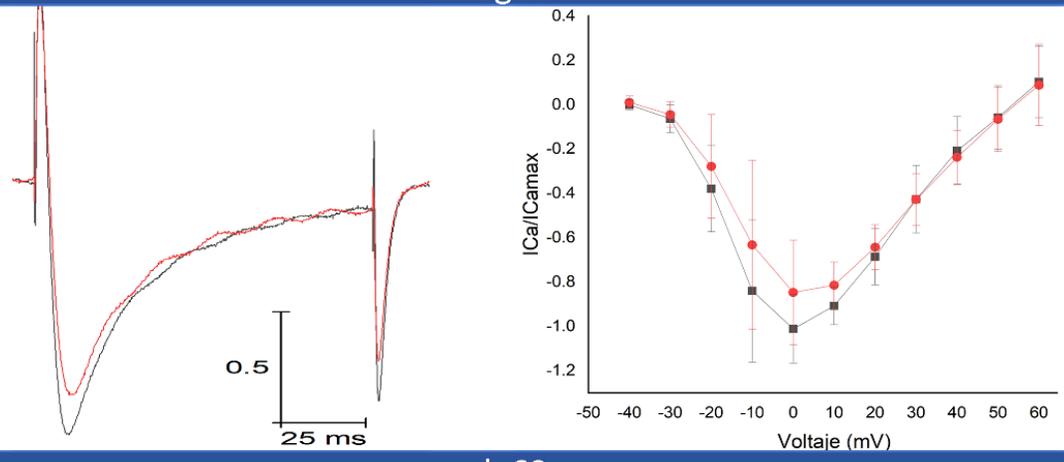
7.3 Péptidos derivados del transcriptoma de la glándula venenosa de *P. verdolaga* modulan I_{CaL} e I_K .

Los 6 péptidos seleccionados a partir del transcriptoma de la glándula venenosa de *P. verdolaga* fueron nombrados preliminarmente como: vrdg66, vrdg69, vrdg164, vrdg172, vrdg177 y vrdg184. El péptido vrdg66 presenta una estructura lineal, NDBP, mientras los restantes presentan entre 1 y 2 puentes disulfuro, en una estructura DBP. Se utilizó una concentración inicial de 1 μ M de cada péptido y se evaluó su efecto sobre I_{CaL} e I_K . Desafortunadamente, no es factible presentar aquí las secuencias primarias de los péptidos dado que por su alto potencial de innovación pueden ser protegidos por patentes. Sin embargo, es posible informar que tuvieron pesos moleculares entre 1,12 y 2,23 kDa, cargas netas entre +2 y +5, y punto isoeléctrico entre 8,7 y 11,2, con una solubilidad en agua mayor a 2 mg/mL. El efecto de los diferentes péptidos tanto para I_{CaL} como I_K fue evaluado en un rango de tiempo entre 5 y 7 minutos posteriores a la obtención de cada corriente control.

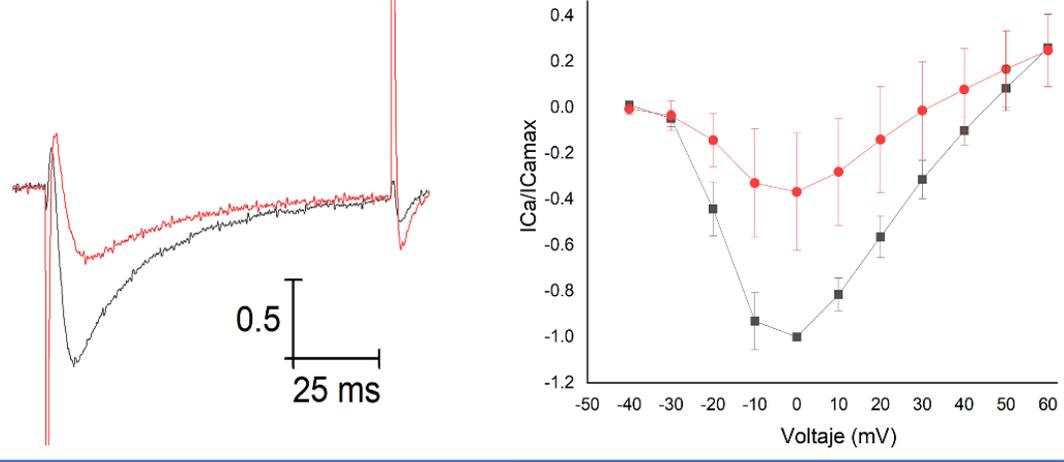
7.3.1 Efecto de péptidos provenientes de *P. verdolaga* sobre I_{CaL}

Los diferentes péptidos demostraron un efecto inhibitorio variable sobre I_{CaL} (Fig. 19), estos resultados fueron normalizados con respecto a la corriente pico control a un potencial de 0 mV ($I_{Ca}/I_{Ca_{max}}$). vrdg69 y vrdg177 (Fig. 19B y E) demostraron una disminución de la corriente pico por encima del 60% (0.36 ± 0.12 y 0.38 ± 0.11 , ambas respecto a la amplitud pico control equivalente a 1), mientras que vrdg172 demostró una disminución de 38.85% (0.61 ± 0.15) (Fig. 19D).

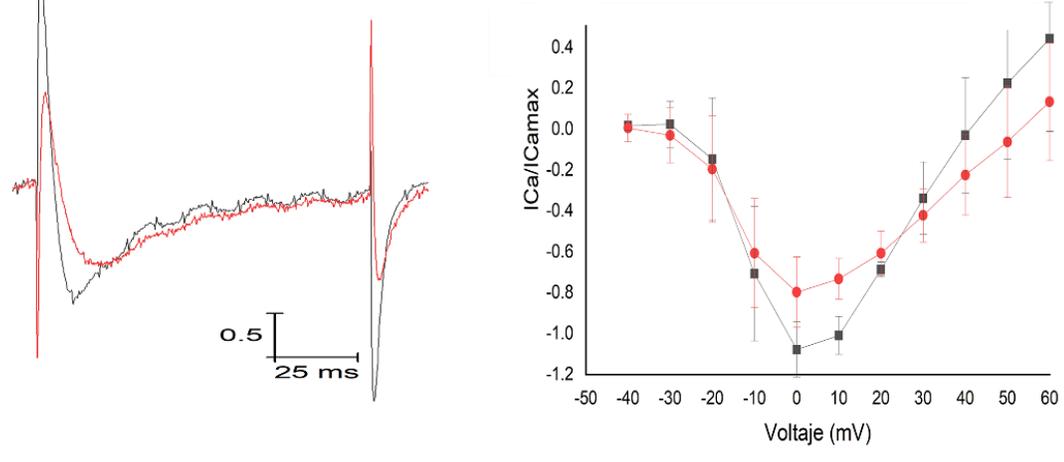
A vrdg66



B vrdg69



C vrdg164



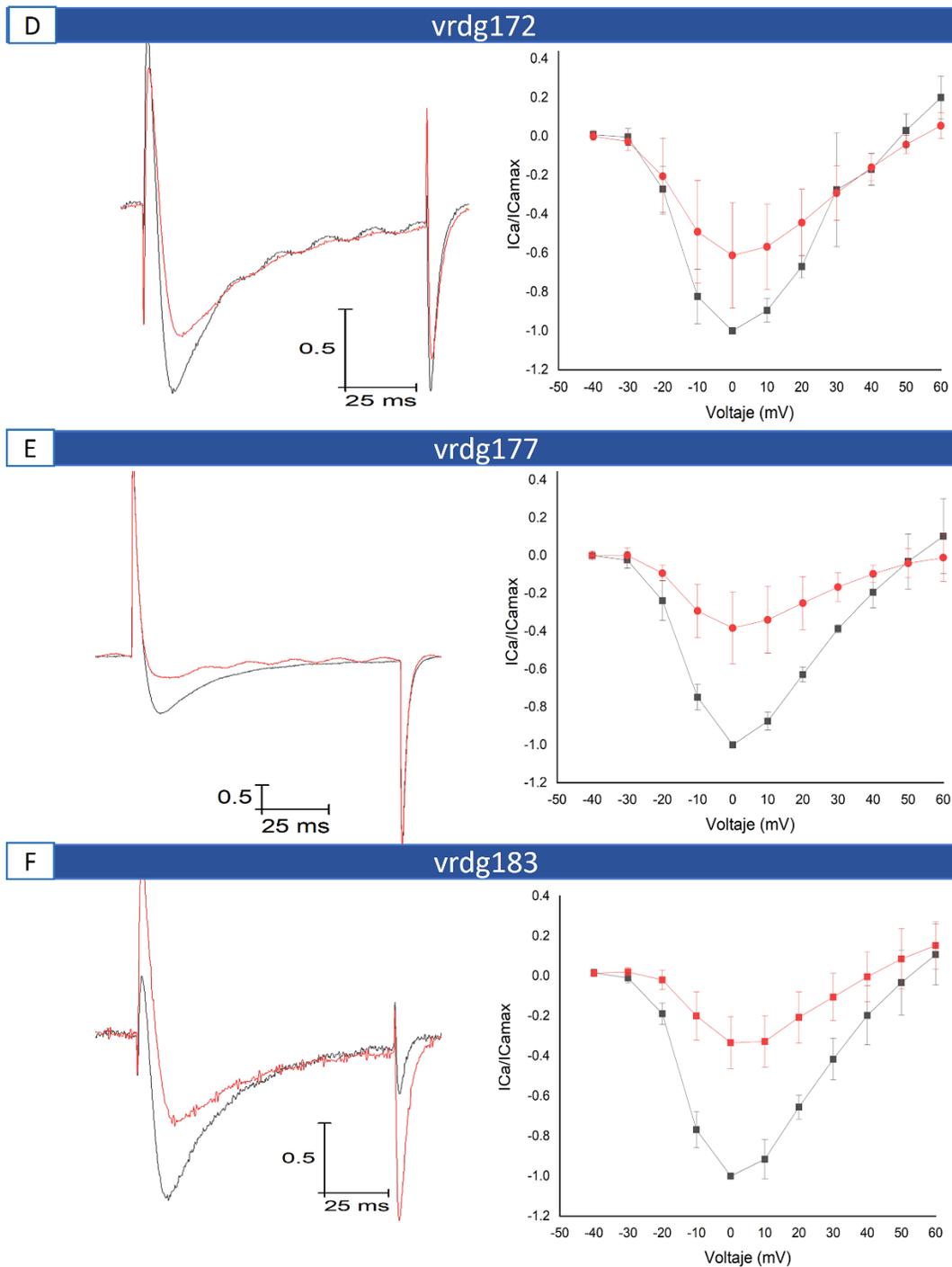


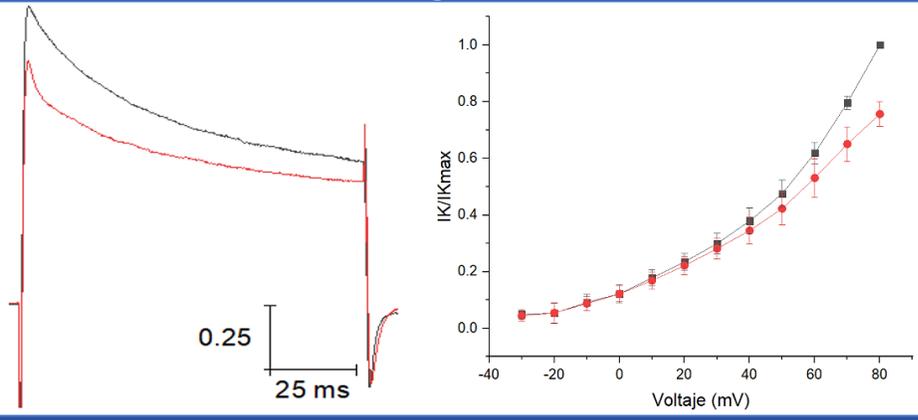
Figura 19. Efecto de péptidos vrdg sobre I_{CaL} en cardiomiocitos de ratón. Curvas IT (izquierda) e I-V (derecha) antes (negro) y después (rojo) de la aplicación de cada péptido. **A.** vrdg66. **B.** vrdg69. **C.** vrdg164. **D.** vrdg172. **E.** vrdg177. **F.** vrdg183. Las curvas IT e I-V fueron normalizadas con respecto a la amplitud pico a potencial 0 mV. Los valores de $I_{Ca}/I_{Ca_{max}}$ después de la incubación con 1 μ M de la toxina (rojo) a un potencial de 0 mV fueron: vrdg66, 0.84 ± 0.12 (n=6); vrdg69, 0.37 ± 0.13 (n=4); vrdg164, 0.79 ± 0.10 (n=3); vrdg172, 0.61 ± 0.16 (n=4); vrdg177, 0.38 ± 0.11 (n=3), vrdg183, 0.33 ± 0.06 (n=4).

Los péptidos vrdg66 y vrdg164 (Fig. 19A y C) no mostraron efecto inhibitorio significativo sobre la amplitud pico, con una inhibición de la corriente pico de 16,25 y 20,20% (0.84 ± 0.10 y 0.79 ± 0.09 respectivamente). El péptido vrdg164 mostró un efecto diferente a los demás, al retrasar el tiempo de activación del canal (Fig. 19C). El péptido vrdg183 mostró resultados particularmente interesantes, porque redujo la corriente pico hasta el 33% del control (0.33 ± 0.06), con un mínimo efecto sobre las I_K , como se muestra en la siguiente sección. En la Tabla 4 se resumen los resultados obtenidos para los diferentes péptidos.

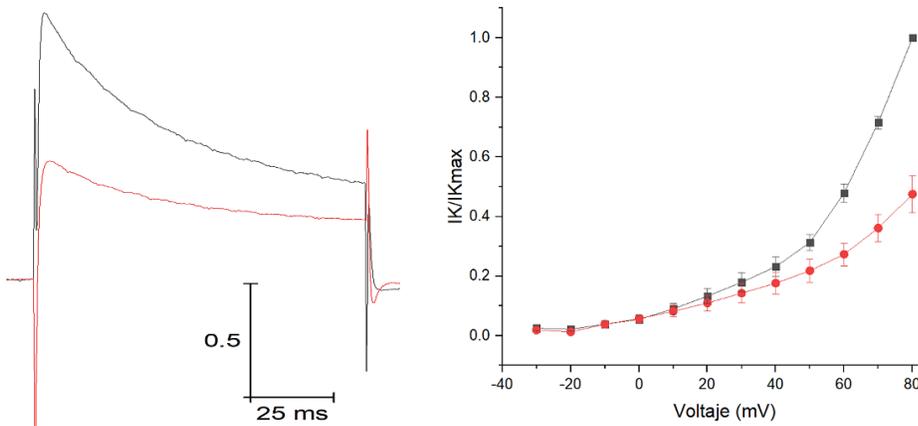
7.3.2 Efecto de péptidos provenientes de *P. verdolaga* sobre I_K

Al igual que sobre I_{CaL} , estos péptidos demostraron un efecto inhibitorio variable sobre I_K (Fig. 20). Los resultados fueron normalizadas con respecto a la corriente pico control a un potencial de +80 mV (I_K/I_{Kmax}). El péptido vrdg69 fue el que demostró mayor efecto inhibitorio sobre I_K con un valor cercano al 63.3% (0.47 ± 0.13 , respecto a la amplitud pico control) (Fig. 20B). Los péptidos vrdg172 y vrdg177 (Fig. 20D y E) demostraron un efecto inhibitorio significativo sobre I_K con un porcentaje de inhibición superior al 40% a la concentración evaluada (0.56 ± 0.05 y 0.59 ± 0.10). vrdg66 mostró una inhibición moderada con una disminución de la amplitud pico de 24.39% (0.75 ± 0.04) (Fig. 20A). Los péptidos vrdg164 (Fig. 20C) y vrdg183 (Fig. 20F) mostraron una disminución de la amplitud pico por debajo del 15% (0.85 ± 0.12 y 0.93 ± 0.24 respectivamente). En las curvas I-V en presencia de todos los péptidos se observa que la mayor diferencia en la amplitud se da en los potenciales más positivos, por arriba de +30 mV. En la Tabla 4 se resumen los resultados obtenidos.

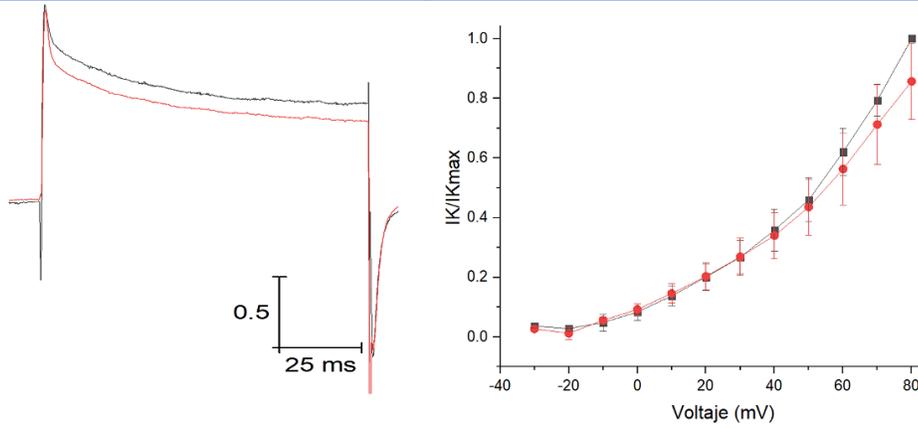
A vrdg66



B vrdg69



C vrdg164



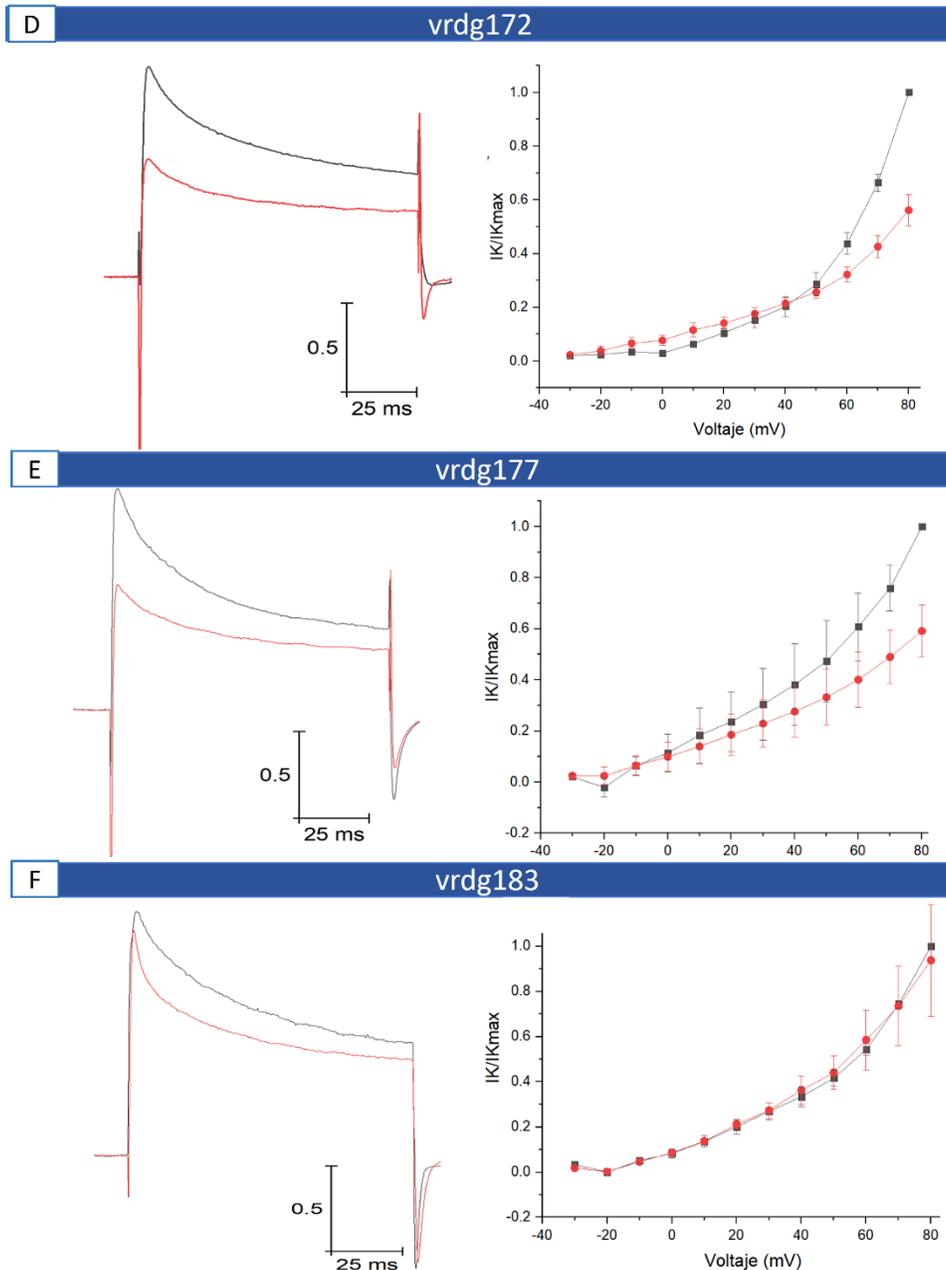


Figura 20. Efecto de péptidos vrdg sobre I_K en cardiomiocitos de ratón. Curvas IT (izquierda) e I-V (derecha) antes (negro) y después (rojo) de la aplicación de cada péptido **A.** vrdg66. **B.** vrdg69. **C.** vrdg164. **D.** vrdg172. **E.** vrdg177. **F.** vrdg183. Las curvas IT e I-V fueron normalizadas con respecto a la amplitud pico a potencial +80. Los valores de I_K/I_{Kmax} después de la incubación con $1 \mu M$ de la toxina (rojo) a un potencial de +80 mV fueron: vrdg66, 0.75 ± 0.04 ($n=5$); vrdg69, 0.47 ± 0.06 ($n=4$); vrdg164, 0.85 ± 0.13 ($n=3$); vrdg172, 0.56 ± 0.06 ($n=3$); vrdg177, 0.59 ± 0.10 ($n=3$); vrdg183, 0.93 ± 0.24 ($n=3$).

Tabla 4. Porcentaje de inhibición de péptidos vrdg sobre I_{CaL} e I_K en cardiomiocitos de ratón

| Péptidos vrdg | I_{CaL} | | | IK | | |
|---------------|-----------|----------------|---------|----|----------------|---------|
| | n | Inhibición (%) | SEM (%) | n | Inhibición (%) | SEM (%) |
| 66 | 6 | -16.3 | 10.5 | 5 | -24.4 | 4.4 |
| 69 | 4 | -63.3 | 12.7 | 4 | -52.5 | 6.3 |
| 164 | 3 | -20.2 | 9.9 | 3 | -14.4 | 12.7 |
| 172 | 4 | -38.8 | 15.6 | 3 | -43.9 | 5.8 |
| 177 | 3 | -61.8 | 10.9 | 3 | -40.9 | 10.1 |
| 183 | 4 | -66.7 | 6.5 | 3 | -6.2 | 24.6 |

Debido a que vrdg183 fue el péptido que demostró mayor potencia y selectividad frente a las corrientes iónicas (alto efecto sobre I_{CaL} , pero muy bajo sobre I_K), se decidió evaluar su efecto en presencia de isoproterenol, esta vez con una metodología no pareada. La Fig. 21 muestra cómo en presencia de isoproterenol a 100 μ M la amplitud pico a 0 mV normalizada a la capacitancia de la membrana (pA/pF) pasó de 7.80 ± 1.40 a 12.50 ± 1.06 (aumento de 60.8%), pero posteriormente al aplicar vrdg183 a 1 μ M se observó una disminución de la amplitud de corriente normalizada a 10.40 ± 1.80 (disminución de 16.8% con respecto a la corriente con isoproterenol). Este resultado no solo confirma el efecto inhibitorio de vrd183 sobre I_{CaL} , sino también demuestra que la vía de activación del Ca_v es totalmente funcional y nuestros resultados son confiables.

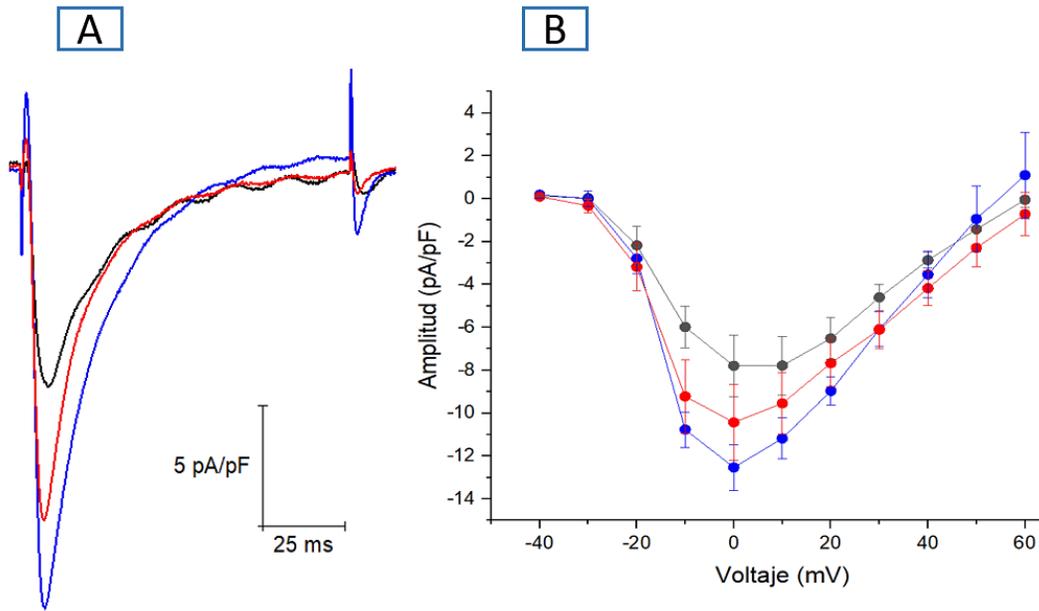


Figura 21. Efecto de isoproterenol y vrdg183 sobre I_{CaL} . **A.** Curva IT de I_{CaL} en ausencia y presencia de isoproterenol y posterior aplicación de vrdg183. Corriente control (negro), potenciación con isoproterenol 100 μM (azul), reducción con isoproterenol 100 μM +vrdg183 1 μM (rojo). **B.** Las curvas I-V (n=4) muestran que posterior a la aplicación de vrdg183 hay disminución de la amplitud pico, sin embargo, esta se mantiene por encima de la amplitud pico control, sin desviaciones a la izquierda o la derecha.

8. Discusión

Los principales resultados de este trabajo fueron: i) se logró el aislamiento exitoso de cardiomiocitos y neuronas del DRG como modelos de células excitables, ii) se caracterizaron I_{CaL} e I_K en cardiomiocitos, iii) se encontraron nuevas toxinas de araña moduladoras de I_{CaL} e I_K en cardiomiocitos.

8.1 Modelos experimentales y calidad de los registros

Los cardiomiocitos utilizados para el presente trabajo de investigación fueron de origen ventricular, los cuales presentaron la morfología que se ha descrito en otros estudios (Gerdes, 2012). En experimentos preliminares habíamos observado que también

producen transitorios de Ca^{2+} cuando se cargan con Mag-Fluo-4 y se estimulan eléctricamente (resultados no mostrados), demostrando la integridad de su membrana. Las neuronas del DRG presentaron la morfología descrita por otros autores (Papka, 2009). La inmunofluorescencia indirecta permitió identificar estas poblaciones celulares, de otras, como células de la glía y fibroblastos, dada la especificidad de los inmunomarcadores anti-NF-200 y anti- β -III-tubulina (Tuj-1) para detectar neuronas (Davies et al., 2019; Gao et al., 2020; Zhen Liu et al., 2011; Nascimento et al., 2018). Además, en nuestras preparaciones pudimos separar las neuronas, positivas para ambos marcadores y para el marcador de núcleos Hoechst, de las células de la glía, sólo positivas para Hoechst. El colorante Mag-Fluo-4 permitió diferenciar células vivas de aquellas degeneradas y muertas. Este colorante tiene afinidad por el Ca^{2+} citoplasmático dando una fluorescencia baja y homogénea, pero cuando se pierde la integridad de la membrana el colorante citoplasmático escapa y una fracción de él queda compartimentalizado en la región perinuclear (retículo endoplásmico), rica en Ca^{2+} , dando una elevada fluorescencia. El Mag-Fluo-4, en conjunto con Rhod-2, ha sido utilizado para evaluar la cinética de Ca^{2+} citoplasmático, en el retículo y en las mitocondrias, así como en neuronas en presencia de 4-aminopiridina (4-AP), un bloqueante no selectivo de K_v (Kasatkina, 2016). Nuestro Grupo tiene al menos una década de experiencia en su uso en diferentes tipos de células excitables (Milán et al., 2021).

Utilizando el modelo de cardiomiocitos logramos estandarizar la técnica de *patch-clamp* con resultados reproducibles y comparables a los publicados por otros autores. Las I_{Ca} en cardiomiocitos son principalmente de tipo L, la isoforma involucrada en esta corriente

es $Ca_v 1.2$. En los experimentos de *patch-clamp* se demostró que la corriente fue bloqueada por nifedipina, un fármaco perteneciente a la familia de las dihidropiridinas, el cual es un antagonista de I_{CaL} ($Ca_v 1.1-1.4$). Nifedipina se usa en experimentos de *patch-clamp* entre 2 y 15 μM y tiene un pIC_{50} -7.59 para $Ca_v 1.2$ (Pignier & Potreau, 2000; Yuchen Wang et al., 2018). A su vez, las corrientes obtenidas respondieron al agonista isoproterenol, como lo reportan otros autores (Hussain & Orchard, 1997; Pelzmann et al, 1995), un compuesto secundario a la noradrenalina que actúa como potente agonista de los receptores β adrenérgicos y activa la ruta de señalización de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y proteína quinasa A (PKA), la cual fosforila $Ca_v 1.2$ y aumenta el flujo de iones a través del canal. Si bien se utilizó una concentración alta de isoproterenol, este experimento se realizó con el fin de garantizar el efecto máximo de la molécula. Estos resultados no sólo demuestran que obtuvimos específicamente I_{CaL} , sino también que la ruta de señalización de activación de los Ca_v es funcional y la célula se encuentra en buenas condiciones para los experimentos que le siguieron con los péptidos. Finalmente, las capacitancias encontradas (en su mayoría superiores a 100 pF) (Swift et al., 2012) y el voltaje al cual se activó la corriente pico (0 mV en la curva I-V) durante los experimentos (Hussain & Orchard, 1997), sugieren que los sellos fueron de alta calidad y hubo un adecuado control de voltaje.

Las I_k obtenidas tienen la cinética transitoria de salida (*transient outward*) descrita por otros autores (Nesher et al., 2014) y fueron sensibles al bloqueante de amplio espectro de K_v TEA. Cabe recordar que los canales de K^+ son diversos y en los cardiomiocitos ventriculares se expresan 3 tipos de corrientes principales (I_{to} , I_{Ks} e I_{Kr}) en las cuales intervienen diferentes isoformas. Para la caracterización de cada una de ellas se

necesitan bloqueantes específicos. El TEA tiene un efecto sobre I_{to} e I_{Ks} a una concentración >100 mM, pero no sobre I_{Kr} (canales hERG) (Kurokawa et al., 2001; Oudit & Backx, 2017; Tamargo et al., 2004), por lo que en nuestros resultados era esperable un bloqueo incompleto de la corriente. Este efecto se hizo evidente en la curva I-V en donde la I_K tiene un comportamiento exponencial en voltajes positivos (principalmente generado por I_{to}) pero posterior a la aplicación de TEA esta toma un comportamiento lineal y de menor amplitud (Fig. 18B). En conjunto, estos resultados permiten garantizar que las corrientes obtenidas tuvieron alta calidad y fueron las de interés: I_{CaL} e I_K .

La caracterización de los modelos celulares basada en técnicas morfológicas, moleculares, y electrofisiológicas, así como la cinética de las corrientes obtenidas, permiten asegurar que los resultados son confiables. Además, abren la posibilidad a nuevas aplicaciones en diferentes áreas de estudio, como la cardiología celular, neurofisiología, evaluación de productos naturales, cardiotoxicidad, etc. Por ejemplo, las neuronas del DRG podrían ser utilizadas para realizar cultivos primarios y estudios de neurofisiología. Otros resultados preliminares nos permitieron obtener sellos de alta resistencia en macrófagos humanos de la línea U937 y registrar I_K (no mostrado), abriendo también la posibilidad de aplicaciones de la electrofisiología celular en inmunología.

8.2 Nuevas toxinas bloqueadoras de canales iónicos

Los péptidos evaluados demostraron efecto inhibitorio variable sobre I_{CaL} e I_K . Los péptidos vrdg69, vrdg177 y vrdg183 generaron una disminución de la amplitud pico por encima del 60% sobre I_{Ca} , mientras que vrdg69, vrdg172 y vrdg177 generaron una disminución por encima del 40% sobre I_K . Los hallazgos sugieren que tanto vrdg69 como

vr dg177 son péptidos que poseen un efecto modulador eficaz sobre I_{CaL} e I_K , siendo poco selectivos. Esto los hace menos interesantes desde la perspectiva del desarrollo de fármacos y como herramientas de investigación, al no permitir aislar corrientes únicas. Como es de esperar, vrdg66, el único péptido sin puentes disulfuro fue el que demostró menor efecto sobre las corrientes iónicas evaluadas, confirmando la calidad de nuestros experimentos. Aunque el péptido vrdg164 fue uno de los que demostró menor efecto modulador de corrientes iónicas, tuvo un efecto interesante al retrasar la activación del canal, ya que la amplitud pico se alcanzó a potenciales más positivos. Este efecto dependiente del voltaje puede indicar que el péptido interactúa con el VSD (Nesher et al., 2014; Orts et al., 2018).

vr dg183 presentó una inhibición eficaz sobre I_{CaL} , pero no significativa sobre I_K , esto lo convierte en una molécula interesante para caracterizar su efecto con mayor profundidad. Además, su efecto inhibitorio se mantuvo aún en cardiomiocitos expuestos a isoproterenol, lo cual refuerza nuestros resultados y confirma su efecto sobre I_{CaL} . Otras toxinas reportadas como PnTx3-6, aislada de la araña *Phoneutria nigriventer*, no demostró un bloqueo completo de la amplitud pico de I_{CaL} a una concentración de 1 μ M (60% inhibición), muy similar al efecto generado por vrdg183 (Vieira et al., 2005). Dado el potencial de vrdg183, es necesario estudiar su efecto sobre la amplitud pico a concentraciones superiores e inferiores para establecer la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) mediante un curva concentración-respuesta. Recientemente, otros autores utilizando rp-HPLC separaron fracciones del veneno de *P. verdolaga*, y por medio de ensayos de influjo de Ca^{2+} por fluorescencia mostraron de forma indirecta que algunas de estas fracciones tenían efecto sobre $Ca_v2.2$, $Ca_v3.2$ y $Na_v1.7$, todas isoformas que se

expresan principalmente en tejido nervioso (Estrada-Gomez et al., 2019). Los autores, sin embargo, no purificaron ninguna toxina ni utilizaron herramientas electrofisiológicas, que son el estándar de oro, para confirmar sus hallazgos. Otros análisis transcriptómicos y bioinformáticos de la glándula venenosa de *P. verdolaga*, han demostrado la presencia de gran variedad de proteínas de alto peso molecular y con posible actividad enzimática, compatibles con fosfolipasas A2, hialuronidasas y esfingomielinasas D (Estrada-Gómez et al., 2021). De esta manera, los resultados del presente trabajo de grado son los primeros que demuestran de manera directa mediante ensayos electrofisiológicos el efecto de toxinas específicas de *P. verdolaga* sobre canales iónicos.

Llama la atención que no encontramos ningún péptido que fuera inhibidor específico de I_K , sin embargo, vrdg69 y vrdg172 mostraron efecto importante sobre este tipo de corrientes. En arañas se han descrito por ejemplo las hanatoxinas de *Grammostola spatulata* o las terapotoxinas de *Hetroscodra maculata* o *Paraphysa scrofa*, inhibidores específicos de I_K . Dado que en este trabajo no evaluamos todas las toxinas DBP de *P. verdolaga*, no podemos descartar que en su transcriptoma haya inhibidores específicos de I_K .

Los péptidos utilizados son confiables porque fueron recibidos liofilizados, lo cual previene su degradación, y una vez resuspendidos fueron conservados congelados a -80 °C en alícuotas, para evitar repetir ciclos congelación-descongelación que pudieran desnaturalizarlos. Además, hubo un claro efecto diferencial entre los DBP (afectaron notoriamente las I_{CaL} e I_K) y el NDBP (efecto mínimo sobre I_{CaL} e I_K), cuyos resultados lo convierten en un control de calidad de nuestros ensayos. En el presente trabajo de investigación no fue factible mostrar las secuencias de los péptidos, dado que tienen un

alto componente de innovación y patente. Sin embargo, confirmamos que tienen estructura DBP y pesos moleculares menores a 10 KDa, con buena solubilidad en agua, características típicas de las toxinas que bloquean canales iónicos.

Sobre el mecanismo de acción de los péptidos, no parece factible un efecto sobre las corrientes mediado por una alteración en los lípidos en los cuales el canal se encuentra insertado. Esto se soporta por el hecho de que no observamos daño inmediato a las células después de la incubación con los péptidos, descartando una permeabilización rápida de la membrana. Además, las propiedades de membrana que medimos (C_m , R_a , R_m) corresponden a los reportados para cardiomiocitos de ratón, y hubieran cambiado si los péptidos alteraran su integridad. Finalmente, el *leak* observado en nuestros registros fue mínimo y el control de voltaje se pudo mantener durante todo el experimento. De esta manera, el mecanismo de inhibición más probable es una interacción directa con el canal.

A excepción de vrdg164 el efecto de los demás péptidos no pareció tener efecto sobre el voltaje de activación de I_{CaL} e I_K , solamente sobre la amplitud de las corrientes, lo cual sugiere que los péptidos pueden tener un mecanismo de acción como bloqueador del poro iónico (*pore blocker* en inglés); para comprobar esta hipótesis es necesario realizar curvas de activación e inactivación. No fue posible establecer ninguna relación interesante entre la carga de los péptidos y su efecto. Por ejemplo, tanto vrdg66 como vrdg183 tienen una carga de +5, pero el primero sólo tuvo un efecto del 16% sobre I_{CaL} , mientras el segundo tuvo un efecto mayor al 60%. La gran diferencia entre ambos péptidos es que vrdg66 es NDBP, mientras vrdg183 es DBP, resaltando la importancia de la estructura DBP, más que su carga, para explicar su efecto.

En conclusión, utilizando el modelo de cardiomiocitos se demostró el efecto de péptidos derivados del transcriptoma de la glándula venenosa de *P. verdolaga*, y reportamos de manera novedosa dos nuevas toxinas (vrdg164 y vrdg183) que modulan Ca_v 1.2 en mamíferos, con futuro potencial de innovación. Siguiendo la nomenclatura propuesta por King y colaboradores en el 2008 proponemos como posible nombre para vrdg164 y vrdg183 los siguientes: ω 1.2-Phtx-Pv164a y ω 1.2-Phtx-Pv183a respectivamente (King et al., 2008).

Este es el primer trabajo de grado presentado a la Corporación de Ciencias Básicas Biomédicas en el cual se lleva a cabo un abordaje electrofisiológico utilizando capacidad instalada en el interior de la Universidad de Antioquia. A su vez, permitirá abrir nuevas puertas para estudios en electrofisiología y otras áreas como farmacología, toxicología y toxicología en nuestro Grupo de investigación PHYSIS y en otros de la Universidad.

9. Fortalezas y debilidades

El presente trabajo estandarizó la obtención y caracterización de dos modelos de células excitables con gran potencial investigativo por primera vez en la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia. Esto se logró con equipos relativamente asequibles y reactivos que son ampliamente usados en laboratorios de investigación.

La medición de I_{CaL} e I_K con sus respectivos moduladores (fármacos y péptidos) se realizó utilizando instrumentación de última generación, en experimentos pareados mediante registros preexposición y postexposición a la molécula de interés. Esto da fortaleza al modelo experimental y es una característica que tienen pocos trabajos de investigación

en *patch-clamp* debido a su dificultad, pero que permitió evaluar el efecto de los diferentes péptidos en tiempo real.

Sin embargo, debido a que se debía mantener el alcance experimental de un trabajo de Maestría, no fue posible evaluar el efecto de los péptidos sobre I_{Na} ni sobre corrientes de neuronas del DRG. Tampoco se evaluaron los péptidos más interesantes a diferentes concentraciones.

10. Perspectivas

Dada la calidad de los modelos celulares sería factible en el corto plazo estandarizar la obtención de I_{Na} y por lo tanto probar el efecto de los péptidos sobre dichas corrientes.

Se debe determinar el IC_{50} de los péptidos más interesantes, por ejemplo, vrdg164 porque parece modular el VSD, y vrdg183, por su mayor especificidad sobre I_{CaL} . Además, se espera evaluar el efecto de estos péptidos sobre la activación e inactivación de I_{CaL} .

Con el objetivo de caracterizar con mayor profundidad el efecto del péptido 183 se espera evaluar como cambia la concentración intracelular de calcio en presencia de este, mediante la medición de transitorios de calcio en cardiomiocitos ventriculares.

En cardiomiocitos ventriculares I_{to} es principalmente generada por isoformas K_v 4.x, por lo cual se planearon experimentos con la toxina κ -theraphotoxin-Ps1b para valorar el aporte de esta isoforma a nuestras corrientes, pero por retrasos en los procesos de compra por parte de la Universidad no fue posible realizarlos.

Para evaluar el efecto de los péptidos más interesantes sobre cada isoforma es necesario el uso de modelos celulares de sobreexpresión (HEK293, CHO, entre otras), se espera realizar experimentos de este tipo en el futuro. A su vez, es importante la evaluación del efecto de estos péptidos en células no excitables como eritrocitos, macrófagos, entre otros.

Se espera realizar la caracterización estructural detallada de los péptidos, con miras a estudios de dinámica molecular y *docking* en caso de que los resultados de los siguientes experimentos lo justifiquen, para comprender el mecanismo molecular exacto de su efecto sobre los canales iónicos.

La información generada en este trabajo es suficiente y promisoria para el inicio de nuevos proyectos que permitan caracterizar mejor los péptidos evaluados e iniciar nuevos proyectos en electrofisiología celular, los cuales podrían tener gran alcance biotecnológico (investigación, agro y medicina).

11. Financiamiento

Proyecto código 111577757673, Síntesis y caracterización de péptidos a partir de venenos de arañas: hacia el desarrollo de nuevos antimicrobianos, financiado por Minciencias.

12. Conflicto de interés

Los autores de este trabajo de grado declaran no tener ningún conflicto de interés.

13. Grado de originalidad

El presente trabajo de investigación logró la estandarización del aislamiento de dos modelos de células excitables: neuronas del DRG y cardiomiocitos. Se logró estandarizar la técnica *patch-clamp*. Se encontraron nuevas toxinas provenientes del transcriptoma de la glándula venenosa de *P.verdolaga* con efecto modulador sobre I_{CaL} e I_K en cardiomiocitos. La obtención de modelos de células excitables y la estandarización de la técnica de *patch-clamp* es novedosa para Colombia. El reporte de dos nuevas toxinas con potencial biotecnológico es novedoso para el mundo.

Grupos de Investigación que apoyan este trabajo de grado

PHYSIS

Es un Grupo categoría A1 (COL0007328) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, con experiencia en fisiología, bioquímica y biofísica. En su laboratorio cuenta con equipos de uso general en investigación (ultracongelador, agitador, medidor de pH, balanza, baño de temperatura controlada, etc), y equipos especializados para fisiología y biofísica celular (microscopio invertido de fluorescencia, amplificadores de electrofisiología, fabricación de pipetas, sistema de fotomultiplicación, etc). Sus principales líneas de investigación incluyen Fisiología del ejercicio y del músculo estriado, Fisiología cardiovascular, Fisiología y biofísica celular y Neurofisiología. Sus más recientes publicaciones se encuentran en revistas como: J Physiol, Eur J Pharmacol, Comp Biochem Physiol, Biochim Biophys Acta, Int J Mol Sci y Eur J Appl Physiol.

<https://www.udea.edu.co/physis>;

<https://scienti.minciencias.gov.co/gruplac/jsp/visualiza/visualizagr.jsp?nro=0000000000>

1725

Biofísica: <https://www.udea.edu.co/biofisica>

Malaria: <https://www.udea.edu.co/malaria>

Bibliografía

Ackers-johnson, M., & Foo, R. S. (2019). Langendorff-Free Isolation and Propagation of Adult Mouse Cardiomyocytes. *Methods in Molecular Biology*, 1940, 193–204. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9086-3_14

Almaaytah, A., & Albalas, Q. (2014). Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: A review. *Peptides*, 51, 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.10.021>

Ayroza, G., Ferreira, I. L. C., Sayegh, R. S. R., Tashima, A. K., & da Silva Junior, P. I. (2012). Juruin: an antifungal peptide from the venom of the Amazonian Pink Toe spider, *Avicularia juruensis*, which contains the inhibitory cystine knot motif. *Frontiers in Microbiology*, 3(SEP), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00324>

Baconguis, I., Bohlen, C. J., Goehring, A., Julius, D., & Gouaux, E. (2014). X-ray structure of acid-sensing ion channel 1-snake toxin complex reveals open state of a Na⁺-selective channel. *Cell*, 156(4), 717–729. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.011>

Bell, R. M., Mocanu, M. M., & Yellon, D. M. (2011). Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 50(6), 940–950. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.02.018>

Beltrán-Vidal, J., Carcamo-Noriega, E., Pastor, N., Zamudio-Zuñiga, F., Guerrero-Vargas, J. A., Castaño, S., ... Restano-Cassulini, R. (2021). Colombian scorpion *centruroides margaritatus*: Purification and characterization of a gamma potassium toxin with full-block activity on the herg1 channel. *Toxins*, 13(6). <https://doi.org/10.3390/toxins13060407>

Berridge, M. J. (1998). Neuronal Calcium Signaling. *Neuron*, 21(1), 13–26. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80510-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80510-3)

Biardi, J. E., & Coss, R. G. (2011). Rock squirrel (*Spermophilus variegatus*) blood sera affects proteolytic and hemolytic activities of rattlesnake venoms. *Toxicon*, 57(2), 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.12.011>

- Biass, D., Dutertre, S., Gerbault, A., Menou, J. L., Offord, R., Favreau, P., & Stöcklin, R. (2009). Comparative proteomic study of the venom of the piscivorous cone snail *Conus consors*. *Journal of Proteomics*, *72*(2), 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.019>
- Bomgardner, M. (2017). *Spider venom: An insecticide whose time has come?* Retrieved from <https://cen.acs.org/articles/95/i11/Spider-venom-insecticide-whose-time.html>
- Bosmans, F., Martin-Eauclaire, M.-F., & Swartz, K. J. (2008). Deconstructing voltage sensor function and pharmacology in sodium channels. *Nature*, *456*(7219), 202–208. <https://doi.org/10.1038/nature07473>
- Bradley Zuchero, J. (2014). Purification of Dorsal root ganglion neurons from rat by immunopanning. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2014*(8), 826–838. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot074948>
- Brunet, S., Aimond, F., Li, H., Guo, W., Eldstrom, J., Fedida, D., ... Nerbonne, J. M. (2004). Heterogeneous expression of repolarizing, voltage-gated K⁺ currents in adult mouse ventricles. *Journal of Physiology*, *559*(1), 103–120. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.063347>
- Catterall, W. A. (2011). Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(8), a003947–a003947. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003947>
- Changeux, J. P. (2018). Structural Identification of the Nicotinic Receptor Ion Channel. *Trends in Neurosciences*, *41*(2), 67–70. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.11.003>
- Chen, J., Liu, X., Yu, S., Liu, J., Chen, R., Zhang, Y., ... Dai, Q. (2021). A novel ω -conotoxin Bu8 inhibiting N-type voltage-gated calcium channels displays potent analgesic activity. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.03.001>
- Cifuentes, Y., Estrada-Gomez, S., Vargas-Muñoz, L. J., & Perafán, C. (2016). Description and molecular characterization of a new species of tarantula, *Pamphobeteus verdolaga*, from Colombia (Araneae: Mygalomorphae: Theraphosidae). *Zoologia (Curitiba)*, *33*(6), 6–11. <https://doi.org/10.1590/s1984-4689zool-20160113>
- Conforti, L. (2012). Patch-Clamp Techniques. In *Cell Physiology Source Book* (Fourth Edi, Vol. 36, pp. 369–381). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387738-3.00020-2>
- Corzo, G., & Escoubas, P. (2003). Pharmacologically active spider peptide toxins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *60*(11), 2409–2426. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3108-6>
- Cushman, D. W., Cheung, H. S., Sabo, E. F., & Ondetti, A. (1977). Design of Potent Competitive Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme. Carboxyalkanoyl and Mercaptoalkanoyl Amino Acids. *Biochemistry*, *16*(25), 5484–5491. <https://doi.org/10.1021/bi00644a014>
- Da Silva, J. F., Castro-Junior, C. J., Oliveira, S. M., Dalmolin, G. D., Silva, C. R., Vieira, L. B., ... Gomez, M. V. (2015). Characterization of the antinociceptive effect of

- PhTx3-4, a toxin from *Phoneutria nigriventer*, in models of thermal, chemical and incisional pain in mice. *Toxicon*, 108, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.09.043>
- Davies, A. J., Kim, H. W., Gonzalez-Cano, R., Choi, J., Back, S. K., Roh, S. E., ... Oh, S. B. (2019). Natural Killer Cells Degenerate Intact Sensory Afferents following Nerve Injury. *Cell*, 176(4), 716-728.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.022>
- Deuis, J. R., Mueller, A., Israel, M. R., & Vetter, I. (2017). The pharmacology of voltage-gated sodium channel activators. *Neuropharmacology*, 127, 87–108. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.04.014>
- e Silva, M. R., Beraldo, W. T., & Rosenfeld, G. (1949). BRADYKININ, A HYPOTENSIVE AND SMOOTH MUSCLE STIMULATING FACTOR RELEASED FROM PLASMA GLOBULIN BY SNAKE VENOMS AND BY TRYPSIN. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 156(2), 261–273. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1949.156.2.261>
- Elinder, F., Nilsson, J., & Århem, P. (2007). On the opening of voltage-gated ion channels. *Physiology and Behavior*, 92(1–2), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.05.058>
- Escoubas, P. (2000). Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. *Biochimie*, 82(9–10), 893–907. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(00\)01166-4](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(00)01166-4)
- Escoubas, P., Diochot, S., Célérier, M.-L., Nakajima, T., & Lazdunski, M. (2002). Novel Tarantula Toxins for Subtypes of Voltage-Dependent Potassium Channels in the Kv2 and Kv4 Subfamilies. *Molecular Pharmacology*, 62(1), 48–57. <https://doi.org/10.1124/mol.62.1.48>
- Escoubas, P., Sollod, B., & King, G. F. (2006). Venom landscapes: Mining the complexity of spider venoms via a combined cDNA and mass spectrometric approach. *Toxicon*, 47(6), 650–663. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.01.018>
- Estrada-Gomez, S., Cardoso, F. C., Vargas-Muñoz, L., Quintana-Castillo, J., Arenas Gómez, C., Pineda, S., & Saldarriaga-Cordoba, M. (2019). Venomic, Transcriptomic, and Bioactivity Analyses of *Pamphobeteus verdolaga* Venom Reveal Complex Disulfide-Rich Peptides That Modulate Calcium Channels. *Toxins*, 11(9), 496. <https://doi.org/10.3390/toxins11090496>
- Estrada-Gómez, S., Vargas-Muñoz, L. J., Latorre, C. S., Saldarriaga-Cordoba, M. M., & Arenas-Gómez, C. M. (2021). Analysis of high molecular mass compounds from the spider *pamphobeteus verdolaga* venom gland. A transcriptomic and ms id approach. *Toxins*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/toxins13070453>
- Favreau, P., & Stöcklin, R. (2009). Marine snail venoms: use and trends in receptor and channel neuropharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(5), 594–601. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.05.006>
- Feher, J. (2012). The Cardiac Action Potential. In *Quantitative Human Physiology* (pp. 528–536). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800883-6.00049-5>

- Fletcher, A. (2019). Action potential: generation and propagation. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, 20(4), 243–247. <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2019.01.014>
- Fry, C. H., & Jabr, R. I. (2010). The action potential and nervous conduction. *Surgery*, 28(2), 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2009.12.001>
- Gandini, M. A., Sandoval, A., & Felix, R. (2018). *Whole-Cell Patch-Clamp Recordings of Ca²⁺ + Currents from Isolated Neonatal Mouse Dorsal Root Ganglion (DRG) Neurons*. 389–396. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot073205>
- Gao, Y., Bai, L., Zhou, W., Yang, Y., Zhang, J., Li, L., ... Xu, J.-T. (2020). PARP-1-regulated TNF- α expression in the dorsal root ganglia and spinal dorsal horn contributes to the pathogenesis of neuropathic pain in rats. *Brain, Behavior, and Immunity*, 88, 482–496. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.04.019>
- Gebhart G.F, S. R. . (Ed.). (2013). Neurofilament Protein NF200. In *Encyclopedia of Pain* (pp. 2046–2046). https://doi.org/10.1007/978-3-642-28753-4_201396
- Geffeney, S. (2002). Mechanisms of Adaptation in a Predator-Prey Arms Race: TTX-Resistant Sodium Channels. *Science*, 297(5585), 1336–1339. <https://doi.org/10.1126/science.1074310>
- Gerdes, A. M. (2012). Cardiomyocyte ultrastructure. In *Muscle* (First Edit, Vol. 1). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381510-1.00005-3>
- Göke, R., Fehmann, H. C., Linn, T., Schmidt, H., Krause, M., Eng, J., & Göke, B. (1993). Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin-(9-39)-amide an antagonist at the glucagon-like peptide 1-(7-36)-amide receptor of insulin-secreting beta-cells. *Journal of Biological Chemistry*, 268(26), 19650–19655. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)36565-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)36565-2)
- Grandi, E., Sanguinetti, M. C., Bartos, D. C., Bers, D. M., Chen-Izu, Y., Chiamvimonvat, N., ... Yarov-Yarovoy, V. (2017). Potassium channels in the heart: structure, function and regulation. *Journal of Physiology*, 595(7), 2209–2228. <https://doi.org/10.1113/JP272864>
- Gutman, G. A., Chandy, K. G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L. A., ... Wang, X. (2005). Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 473–508. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.10.1>
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981a). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 391(2), 85–100. <https://doi.org/10.1007/BF00656997>
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981b). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 391(2), 85–100. <https://doi.org/10.1007/BF00656997>

- Haven, W. (2009). *Dorsal Root Ganglion Neurons*. 615–619. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.01660-0>
- Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of Physiology*, 117(4), 500–544. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1952.sp004764>
- Hodgson, E. (2012). Toxins and venoms. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (1st ed., Vol. 112). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415813-9.00014-3>
- Hodgson, W. C., & Isbister, G. K. (2009). The application of toxins and venoms to cardiovascular drug discovery. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(2), 173–176. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2008.11.007>
- Huang, P.-T., Shiau, Y.-S., & Lou, K.-L. (2007). The interaction of spider gating modifier peptides with voltage-gated potassium channels. *Toxicon*, 49(2), 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.09.015>
- Hussain, M., & Orchard, C. H. (1997). Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content, L-type Ca²⁺ current and the Ca²⁺ transient in rat myocytes during β -adrenergic stimulation. *The Journal of Physiology*, 505(2), 385–402. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1997.385bb.x>
- Israel, M. R., Tay, B., Deuis, J. R., & Vetter, I. (2017). Sodium Channels and Venom Peptide Pharmacology. In *Advances in Pharmacology* (1st ed., Vol. 79). <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.01.004>
- Jost, N., Virág, L., Bitay, M., Takács, J., Lengyel, C., Biliczki, P., ... Varró, A. (2005). Restricting excessive cardiac action potential and QT prolongation: A vital role for IKs in human ventricular muscle. *Circulation*, 112(10), 1392–1399. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.550111>
- Kasatkina, L. A. (2016). 4-Aminopyridine sequesters intracellular Ca²⁺ which triggers exocytosis in excitable and non-excitable cells. *Scientific Reports*, 6(1), 34749. <https://doi.org/10.1038/srep34749>
- Katsetos, C. D., Legido, A., Perentes, E., & Mörk, S. J. (2003). Class III β -tubulin isotype: A key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology. *Journal of Child Neurology*, 18(12), 851–866. <https://doi.org/10.1177/088307380301801205>
- King, G. F., Gentz, M. C., Escoubas, P., & Nicholson, G. M. (2008). A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals. *Toxicon*, 52(2), 264–276. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.05.020>
- King, G. F., & Hardy, M. C. (2013). Spider-Venom Peptides: Structure, Pharmacology, and Potential for Control of Insect Pests. *Annual Review of Entomology*, 58(1), 475–496. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153650>
- Kornreich, B. G. (2007). The patch clamp technique: Principles and technical considerations. *Journal of Veterinary Cardiology*, 9(1), 25–37.

<https://doi.org/10.1016/j.jvc.2007.02.001>

- Kozlov, S. (2018). Animal toxins for channelopathy treatment. *Neuropharmacology*, 132, 83–97. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.10.031>
- Kuhn-Nentwig, L., Stöcklin, R., & Nentwig, W. (2011). Venom composition and strategies in spiders. is everything possible? In *Advances in Insect Physiology* (Vol. 40). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387668-3.00001-5>
- Kumari, N., Gaur, H., & Bhargava, A. (2018). Cardiac voltage gated calcium channels and their regulation by β -adrenergic signaling. *Life Sciences*, 194(December 2017), 139–149. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.12.033>
- Kurokawa, J., Motoike, H. K., & Kass, R. S. (2001). Tea+-Sensitive Kcnq1 Constructs Reveal Pore-Independent Access to Kcne1 in Assembled IKs Channels. *Journal of General Physiology*, 117(1), 43–52. <https://doi.org/10.1085/jgp.117.1.43>
- Kuryshv, Y. A., Gudz, T. I., Brown, A. M., & Wible, B. A. (2000). KChAP as a chaperone for specific K⁺ channels. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 278(5 47-5), 931–941. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.278.5.c931>
- Kushnir, A., & Marx, S. O. (2018). Voltage-Gated Calcium Channels. In *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside: Seventh Edition* (Seventh Ed). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44733-1.00002-X>
- Levinson, S. R., & Sather, W. A. (2012). Structure and Mechanism of Voltage-Gated Ion Channels. In *Cell Physiology Source Book* (Fourth Edi, pp. 383–408). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387738-3.00021-4>
- Li, D., Xiao, Y., Hu, W., Xie, J., Bosmans, F., Tytgat, J., & Liang, S. (2003). Function and solution structure of hainantoxin-I, a novel insect sodium channel inhibitor from the Chinese bird spider *Selenocosmia hainana*. *FEBS Letters*, 555(3), 616–622. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01303-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01303-6)
- Li, G. R., & Dong, M. Q. (2010). Pharmacology of Cardiac Potassium Channels. *Advances in Pharmacology*, 59(C), 93–134. [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(10\)59004-5](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(10)59004-5)
- Li, S., Sunchen, S., He, D., Qin, C., Zuo, Z., Shen, B., ... Miao, L. (2019). ImKTx96, a peptide blocker of the Kv1.2 ion channel from the venom of the scorpion *Isometrus maculatus*. *Peptides*, 301, 170172. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.170172>
- Li, W. E. I., Gao, S., Lv, C., Wu, Y., Guo, Z., & Ding, J. (2006). *Characterization of Voltage- and Ca²⁺ R -Activated K⁺ R Channels in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons*. (December), 348–357. <https://doi.org/10.1002/JCP>
- Lier, G. E. (2019). Chapter 1: Introduction. *A Redaction History of the Pentateuch Targums*, (Chapter 18), 1–16. <https://doi.org/10.31826/9781463222581-006>
- Lin, Y. T., & Chen, J. C. (2018). Dorsal root ganglia isolation and primary culture to study neurotransmitter release. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(140), 1–7. <https://doi.org/10.3791/57569>

- Lipscombe, D., & Toro, C. P. (2014). Biophysics of Voltage-Gated Ion Channels. In *From Molecules to Networks: An Introduction to Cellular and Molecular Neuroscience: Third Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397179-1.00013-0>
- Liu, Z., Deng, M., Xiang, J., Ma, H., Hu, W., Zhao, Y., ... Liang, S. (2012). A Novel Spider Peptide Toxin Suppresses Tumor Growth Through Dual Signaling Pathways. *Current Molecular Medicine*, 12(10), 1350–1360. <https://doi.org/10.2174/156652412803833643>
- Liu, Zhen, Gao, W., Wang, Y., Zhang, W., Liu, H., & Li, Z. (2011). Neuregulin-1 β regulates outgrowth of neurites and migration of neurofilament 200 neurons from dorsal root ganglial explants in vitro. *Peptides*, 32(6), 1244–1248. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.04.005>
- Marani, E. (2017). *Dorsal Root or Spinal Ganglion q*. (November 2015), 1–10. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.04160-2>
- Martinez-Ortiz, W., & Cardozo, T. J. (2018). An Improved Method for Modeling Voltage-Gated Ion Channels at Atomic Accuracy Applied to Human Cav Channels. *Cell Reports*, 23(5), 1399–1408. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.024>
- Meriney, S. D., & Fanselow, E. E. (2019). Ion Channels and Action Potential Generation. In *Synaptic Transmission* (Vol. 27, pp. 35–63). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815320-8.00004-1>
- Mewes, T., & Ravens, U. (1994). L-type calcium currents of human myocytes from ventricle of non-failing and failing hearts and from atrium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, Vol. 26, pp. 1307–1320. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1994.1149>
- Milán, A. F., Rincón, O. A., Arango, L. B., Reutovich, A. A., Smith, G. L., Giraldo, M. A., ... Calderón, J. C. (2021). Calibration of mammalian skeletal muscle Ca²⁺ transients recorded with the fast Ca²⁺ dye Mag-Fluo-4. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1865(9), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2021.129939>
- Nakamura, H., Ding, W. G., Sanada, M., Maeda, K., Kawai, H., Maegawa, H., & Matsuura, H. (2010). Presence and functional role of the rapidly activating delayed rectifier K⁺ current in left and right atria of adult mice. *European Journal of Pharmacology*, 649(1–3), 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.08.025>
- Nascimento, A. I., Mar, F. M., & Sousa, M. M. (2018). The intriguing nature of dorsal root ganglion neurons: Linking structure with polarity and function. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 168). <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.05.002>
- Nesher, N., Zlotkin, E., & Hochner, B. (2014). The sea anemone toxin AdE-1 modifies both sodium and potassium currents of rat cardiomyocytes. *Biochemical Journal*, 461(1), 51–59. <https://doi.org/10.1042/BJ20131454>
- Nicholson, G. M. (2013). Spider Peptides. In *Handbook of Biologically Active Peptides* (pp. 461–472). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385095-9.00063-4>
- Nicoletti, N. F., Erig, T. C., Zanin, R. F., Roxo, M. R., Ferreira, N. P., Gomez, M. V., ... Campos, M. M. (2017). Pre-clinical evaluation of voltage-gated calcium channel

- blockers derived from the spider *P. nigriventer* in glioma progression. *Toxicol*, 129, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2017.02.001>
- Ortiz, E., Gurrola, G. B., Schwartz, E. F., & Possani, L. D. (2015). Scorpion venom components as potential candidates for drug development. *Toxicol*, 93, 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2014.11.233>
- Orts, D. J. B., Peigneur, S., Silva-Gonçalves, L. C., Arcisio-Miranda, M., Bicudo, J. E. P. W., & Tytgat, J. (2018). AbeTx1 is a novel sea anemone toxin with a dual mechanism of action on shaker-type K⁺ channels activation. *Marine Drugs*, 16(10). <https://doi.org/10.3390/md16100360>
- Oudit, G. Y., & Backx, P. H. (2017). Voltage-Gated Potassium Channels. In *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside* (Seventh Ed). <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-44733-1.00003-1>
- Oudit, G. Y., Kassiri, Z., Sah, R., Ramirez, R. J., Zobel, C., & Backx, P. H. (2001). The molecular physiology of the cardiac transient outward potassium current (I_{to}) in normal and diseased myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 33(5), 851–872. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2001.1376>
- Papka, R. E. (2009). *Sensory Ganglia*. 657–668.
- Pelzmann, B., Schaffer, P., Mächler, H., Rigler, B., & Koidl, B. (1995). Adenosine inhibits the L-type calcium current in human atrial myocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 351(3), 293–297. <https://doi.org/10.1007/BF00233249>
- Piedras-Rentería, E. S., Barrett, C. F., Cao, Y. Q., & Tsien, R. W. (2007). Voltage-gated calcium channels, calcium signaling, and channelopathies. *New Comprehensive Biochemistry*, 41(06), 127–166. [https://doi.org/10.1016/S0167-7306\(06\)41005-X](https://doi.org/10.1016/S0167-7306(06)41005-X)
- Pignier, C., & Potreau, D. (2000). Characterization of nifedipine-resistant calcium current in neonatal rat ventricular cardiomyocytes. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 279(5 48-5), 2259–2268. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.279.5.h2259>
- Pineda, S. S., Undheim, E. A. B., Rupasinghe, D. B., Ikononopoulou, M. P., & King, G. F. (2014). Spider venomomics: implications for drug discovery. *Future Medicinal Chemistry*, 6(15), 1699–1714. <https://doi.org/10.4155/fmc.14.103>
- Polder, H. R., Weskamp, M., Linz, K., & Meyer, R. (2005). Voltage-clamp and patch-clamp techniques. *Practical Methods in Cardiovascular Research*, 272–323. https://doi.org/10.1007/3-540-26574-0_16
- Pongs, O., Leicher, T., Berger, M., Roeper, J., Bähring, R., Wray, D., ... Storm, J. F. (1999). Functional and molecular aspects of voltage-gated K⁺ channel β subunits. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 868, 344–355. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb11296.x>
- Raschi, E., Ceccarini, L., De Ponti, F., & Recanatini, M. (2009). HERG-related drug toxicity and models for predicting hERG liability and QT prolongation. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 5(9), 1005–1021.

<https://doi.org/10.1517/17425250903055070>

- Rash, L. D., & Hodgson, W. C. (2002). Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon*, *40*(3), 225–254. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00199-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00199-4)
- Rigo, F. K., Trevisan, G., Rosa, F., Dalmolin, G. D., Otuki, M. F., Cueto, A. P., ... Gomez, M. V. (2013). Spider peptide Ph α 1 β induces analgesic effect in a model of cancer pain. *Cancer Science*, *104*(9), 1226–1230. <https://doi.org/10.1111/cas.12209>
- Roy, M. L., & Narahashi, T. (1994). Sodium Channels of Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. In *Methods in Neurosciences* (Vol. 19). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-185287-0.50008-9>
- Rycroft, B., Halliday, F., & Gibb, A. (2006). Patch Clamping. In *Cell Biology* (pp. 395–403). <https://doi.org/10.1016/B978-012164730-8/50049-6>
- Saez, N. J., & Herzig, V. (2019). Versatile spider venom peptides and their medical and agricultural applications. *Toxicon*, *158*(May 2018), 109–126. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.11.298>
- Sakmann, B., & Neher, E. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, *260*(5554), 799–802. <https://doi.org/10.1038/260799a0>
- Sanguinetti, M. C., Johnson, J. H., Hammerland, L. G., Kelbaugh, P. R., Volkman, R. A., Saccomano, N. A., & Mueller, A. L. (1997). Heteropodatoxins: peptides isolated from spider venom that block Kv4.2 potassium channels. *Molecular Pharmacology*, *51*(3), 491–498. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9058605>
- Savalli, Nicoletta; Angelini, Marina; Pezhouman, Arash; Karagueuzian, Hrayr; Weiss, James; Olcese, R. (2016). *Gabapentinoids as an Archetypal New Class of Antiarrhythmics that Acts as CaV1.2 Gating-modifiers*.
- Scanlon, M. J., Naranjo, D., Thomas, L., Alewood, P. F., Lewis, R. J., & Craik, D. J. (1997). Solution structure and proposed binding mechanism of a novel potassium channel toxin κ -conotoxin PVIIA. *Structure*, *5*(12), 1585–1597. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(97\)00307-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(97)00307-9)
- Skrzypiec-Spring, M., Grotthus, B., Szlag, A., & Schulz, R. (2007). Isolated heart perfusion according to Langendorff-Still viable in the new millennium. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, *55*(2), 113–126. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2006.05.006>
- Suchyna, T. M., Markin, V. S., & Sachs, F. (2009). Biophysics and structure of the patch and the gigaseal. *Biophysical Journal*, *97*(3), 738–747. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.05.018>
- Swartz, K. J., & MacKinnon, R. (1995). An inhibitor of the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a Chilean tarantula. *Neuron*, *15*(4), 941–949. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90184-1](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90184-1)
- Swift, F., Franzini-Armstrong, C., Yøehaug, L., Enger, U. H., Andersson, K. B.,

- Christensen, G., ... Louch, W. E. (2012). Extreme sarcoplasmic reticulum volume loss and compensatory T-tubule remodeling after Serca2 knockout. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(10), 3997–4001. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120172109>
- Tamargo, J., Caballero, R., Gómez, R., Valenzuela, C., & Delpón, E. (2004). Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovascular Research*, 62(1), 9–33. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.12.026>
- Tan, H., Ding, X., Meng, S., Liu, C., Wang, H., Xia, L., ... Liang, S. (2013). Antimicrobial potential of lycosin-I, a cationic and amphiphilic peptide from the venom of the spider *Lycosa singorensis*. *Current Molecular Medicine*, 13(6), 900–910. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23638903>
- Tsantoulas, C., & McMahon, S. B. (2014). Opening paths to novel analgesics : the role of potassium channels in chronic pain. *Trends in Neurosciences*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.12.002>
- van der Peet, P. L., Sandanayake, S., Jarrott, B., & Williams, S. J. (2019). Discovery of N-Aryloxypropylbenzylamines as Voltage-Gated Sodium Channel Na V 1.2-Subtype-Selective Inhibitors. *ChemMedChem*. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201800781>
- Vieira, L. B., Kushmerick, C., Hildebrand, M. E., Garcia, E., Stea, A., Cordeiro, M. N., ... Snutch, T. P. (2005). Inhibition of high voltage-activated calcium channels by spider toxin PnTx3-6. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 314(3), 1370–1377. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.087023>
- Wang, Yongjun, Wang, L., Yang, H., Xiao, H., Farooq, A., Liu, Z., ... Shi, X. (2016). The spider venom peptide lycosin-II has potent antimicrobial activity against clinically isolated bacteria. *Toxins*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/toxins8050119>
- Wang, Yuchen, Tang, S., Harvey, K. E., Salyer, A. E., Li, T. A., Rantz, E. K., ... Hockerman, G. H. (2018). Molecular Determinants of the Differential Modulation of Ca v 1.2 and Ca v 1.3 by Nifedipine and FPL 64176. *Molecular Pharmacology*, 94(3), 973–983. <https://doi.org/10.1124/mol.118.112441>
- Weir, C. J. (2016). Ion channels, receptors, agonists and antagonists. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, 17(12), 645–651. <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2016.09.016>
- Wisedchaisri, G., Tonggu, L., McCord, E., Gamal El-Din, T. M., Wang, L., Zheng, N., & Catterall, W. A. (2019). Resting-State Structure and Gating Mechanism of a Voltage-Gated Sodium Channel. *Cell*, 178(4), 993-1003.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.06.031>
- Wu, J., Yan, Z., Li, Z., Qian, X., Lu, S., Dong, M., ... Yan, N. (2016). Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 at 3.6 Å resolution. *Nature*, 537(7619), 191–196. <https://doi.org/10.1038/nature19321>
- Xu, L., Ding, X., Wang, T., Mou, S., Sun, H., & Hou, T. (2019). Voltage-gated sodium channels: structures, functions, and molecular modeling. *Drug Discovery Today*,

24(7), 1389–1397. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.05.014>

- Yan, L., & Adams, M. E. (1998). Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(4), 2059–2066. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.4.2059>
- Yang, M., Zhao, S., Min, X., Shao, M., Chen, Y., Chen, Z., & Zhou, M. (2017). A novel μ -conotoxin from worm-hunting *Conus tessulatus* that selectively inhibit rat TTX-resistant sodium currents. *Toxicon*, 130, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.02.013>
- Zhang, R. Y., Du, J. B., Sun, Y., Chen, S., Tsai, H. J., Yuan, L., ... Jin, H. F. (2011). Sulfur dioxide derivatives depress L-type calcium channel in rat cardiomyocytes. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 38(7), 416–422. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05528.x>
- Zhao, H., Kong, Y., Wang, H., Yan, T., Feng, F., Bian, J., ... Yu, H. (2011). A defensin-like antimicrobial peptide from the venoms of spider, *Ornithoctonus hainana*. *Journal of Peptide Science*, 17(7), 540–544. <https://doi.org/10.1002/psc.1370>
- Zuchero, J. B. (2014). Purification and culture of dorsal root ganglion neurons. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2014(8), 813–814. <https://doi.org/10.1101/pdb.top073965>

ANEXOS

Anexo 1. Isoformas de K_v, ubicación en diferentes tejidos y patologías asociados a su disfunción

| Distribución de K _v en células excitables y no excitables | | | |
|--|---|--|--|
| Tipo | Tejido primario | Tejido no excitable | Canalopatías |
| Kv1.1 | SNC, corazón, retina, músculo esquelético | Islotes de pancreáticos | Ataxia episódica/Síndrome mioquimia tipo 1 |
| Kv1.2 | Neuronas SNC, corazón, retina | Islotes de pancreáticos | No conocidas |
| Kv1.3 | Neuronas SNC | Pulmones, islotes de pancreáticos, bazo, linfonodos, fibroblastos. | No conocidas |
| Kv1.4 | Cerebro, músculo esquelético, corazón. | Islotes pancreáticos | No conocidas |
| Kv1.5 | SNC, Aorta, Colon | Riñón, estómago, arteria pulmonar | No conocidas |
| Kv1.6 | Cerebro, Corazón, músculo esquelético. | Pulmones, ovario, células germinales | No conocidas |
| Kv1.7 | Músculo esquelético, corazón. | Placenta | No conocidas |
| Kv1.8 | Cerebro, corazón, músculo esquelético | Riñón, glándula adrenal | No conocidas |
| Kv2.1 | Cerebro, corazón, músculo esquelético, retina. | Célula germinal, pulmón, insulinomas | Kv 2.1 se encuentra reducida su expresión en hipertensión hipóxica pulmonar. |
| Kv2.2 | Cerebro, corazón, músculo liso gastrointestinal | Lengua | No conocidas |
| Kv3.1 | Cerebro, músculo esquelético | Pulmón, células germinales, tejido testicular. | Ratones Kv 3.1 -/- exhiben alteración de las habilidades motrices y fuerza de contracción muscular. Doble knock-out expresen ataxia severa, mioclonos. |
| Kv3.2 | SNC | Islotes pancreáticos | No conocidas |
| Kv3.3 | Cerebro, corazón | Arteria mesentérica, cristalino y epitelio corneal | No conocidas |
| Kv3.4 | Cerebro, músculo esquelético. | Paratiroides, próstata, islotes pancreáticos | Parálisis periódica de músculo esquelético. |
| Kv4.1 | Cerebro, corazón | Pulmón, estómago, testículo, hígado, glándula tiroides. | No conocidas |
| Kv4.2 | SNC, corazón | | Ratones KChIP2 -/- son susceptibles a taquicardia ventricular. |
| Kv4.3 | Cerebro, corazón, músculo liso | | mRNA de Kv 4.3 están disminuidos en fibrilación atrial paroxística. |
| Kv5.1 | Cerebro, corazón, músculo esquelético | Hígado, riñón, páncreas | No conocidas |
| Kv6.1 | Cerebro, músculo esquelético, | Útero, ovario, riñón, hueso, próstata, piel, tejido testicular | No conocidas |
| Kv6.2 | Corazón, cerebro fetal | Células germinales B | No conocidas |
| Kv6.3 | SNC | Timo, glándula adrenal | No conocidas |
| Kv6.4 | Cerebro | Hígado, Intestino delgado, colon | No conocidas |

| | | | |
|---------------|--|---|--|
| Kv7.1 | Corazón | Riñón, páncreas, pulmón, placenta | Síndrome de QT largo y arritmias ventriculares |
| Kv7.2 | SNC, SNP, corazón, ojo, neuroblastoma | Placenta, células germinales, mamas. | Convulsiones neonatal benignas y mioquimias |
| Kv7.3 | Cerebro, retina. | Tejido testicular | Convulsión neonatal benigna |
| Kv7.4 | Órganos vestibulares y núcleo auditorio cerebral. | | Mutaciones en KCNQ4 causa sordera no sindrómica autosomal dominante tipo 2 |
| Kv7.5 | SNC, SNP, músculo esquelético | | Se han identificado diferentes variantes alélicas. |
| Kv8.1 | SNC | Riñón | No conocidas |
| Kv8.2 | | Pulmón, hígado, timo, próstata, ovario, tejido testicular | No conocidas |
| Kv9.1 | Cerebro, cristalino | Melanocitos | No conocidas |
| Kv9.2 | SNC, retina | | No conocidas |
| Kv9.3 | Cerebro, corazón, ojo. | Mama, riñón, testículo, piel, útero | No conocidas |
| Kv10.1 | SNC, músculo esquelético. | Células de melanoma | K _v 10.1 ha sido relacionado con carcinoma cervical en humanos. |
| Kv10.2 | Cerebro | | No conocidas |
| Kv11.1 | Cerebro, corazón, leiomiomasarcoma, neuroblastoma. | Corazón, riñón, hígado, tonsilas, páncreas, próstata, ovario, testículo, útero. | Mutación de este gen causa Síndrome de QT largo |
| Kv11.2 | Cerebro, neuroblastoma | Útero | No conocidas |
| Kv11.3 | SNC | | No conocidas |
| Kv12.1 | SNC, SNP | Pulmón, útero, células leucémicas precursoras de células B | No conocidas |
| Kv12.2 | SNC, SNP, ojo | Linfocitos, células leucémicas | No conocidas |
| Kv12.3 | SNC, neuroblastoma | Pulmón, células B primarias | No conocidas |

SNC: Sistema nervioso central. SNP: Sistema nervioso periférico (*Gutman et al., 2005*).