



Cribado farmacológico para el Síndrome de Dravet

Tesis Doctoral



Verónica Rivero Hernández

Elche, 2017

Directores: Antonio Ferrer Montiel y Antonio Felipe Campo



UNIVERSITAS
Miguel
Hernández



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



SÍNDROME DE DRAVET
FUNDACIÓN

Don Antonio Ferrer Montiel, Catedrático de Bioquímica Y Biología Molecular y Director del Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

DA SU CONFORMIDAD a la lectura de la Tesis Doctoral titulada: **“Cribado farmacológico para el Síndrome de Dravet”**, presentada por Dña. Verónica Rivero Hernández.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firma el presente certificado en Elche, a de Julio de 2017.

Fdo.: Prof. Antonio Ferrer Montiel.



UNIVERSITAT
Miguel
Hernández



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



SÍNDROME DE DRAVET
FUNDACIÓN

D. Antonio Ferrer Montiel, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández de Elche y **D. Antonio Felipe Campo**, Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Barcelona.

CERTIFICAN que el trabajo de investigación que lleva por título: “**Cribado Farmacológico para el Síndrome de Dravet**”, presentado por **Dña. Verónica Rivero Hernández**, ha sido realizado bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche. Considerando que la presente tesis se halla concluida, **AUTORIZAN** su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Para que conste y surta los efectos oportunos, se expide el presente escrito.

Elche, a de Julio de 2017

Fdo.: Dr. Antonio Ferrer Montiel

Fdo.: Dr. Antonio Felipe Campo



UNIVERSITAT
Miguel
Hernández



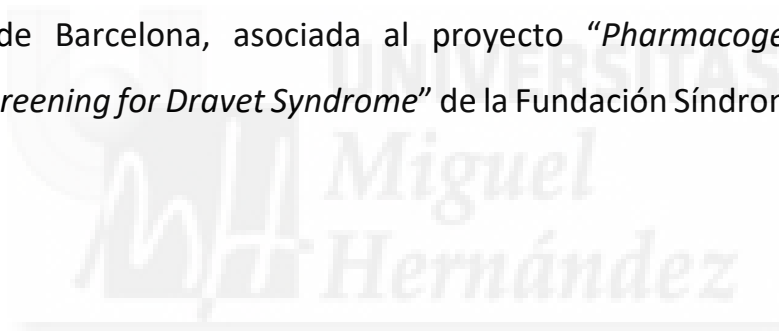
UNIVERSITAT DE
BARCELONA



SÍNDROME DE DRAVET
FUNDACIÓN

El presente trabajo ha sido realizado en el Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC) de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Esta tesis doctoral ha sido posible gracias a una beca concedida a la Universidad de Barcelona, asociada al proyecto “*Pharmacogenomic high-throughput screening for Dravet Syndrome*” de la Fundación Síndrome de Dravet.



A mis amores,



ÍNDICE

<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i>	<i>III</i>
<i>ÍNDICE DE TABLAS</i>	<i>VI</i>
<i>LISTADO DE ABREVIATURAS</i>	<i>VII</i>
<i>RESUMEN</i>	<i>XI</i>
INTRODUCCIÓN	1
1 <i>CANALES IÓNICOS</i>	3
1.1 Canales iónicos dependientes de voltaje	5
1.2 Canales de sodio	7
1.2.1 SCN1A	16
1.2.2 SCN8A	17
2 <i>EPILEPSIA Y EPILEPTOGÉNESIS</i>	19
3 <i>SÍNDROME DE DRAVET</i>	23
3.1 Fenotipo	24
3.2 Etiología genética	27
3.3 Patofisiología y genotipo	33
3.4 Diagnóstico	37
3.5 Farmacología y Tratamientos	37
OBJETIVOS	41
MATERIALES Y MÉTODOS	45
1 <i>LÍNEAS CELULARES Y ANIMALES</i>	47
1.1 Líneas celulares	47
1.2 Animales	48
2 <i>ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA</i>	49
2.1 Extracción y aislamiento de ARN	49
2.2 Amplificación mediante PCR	50
2.3 Detección mediante electroforesis en gel de agarosa	51
3 <i>FLPR®; POTENCIAL DE MEMBRANA</i>	52
4 <i>ELECTROFISIOLOGÍA: IONFLUX™ -16</i>	55
4.1 IONFLUX™: PLATAFORMA AUTOMÁTICA DE PATCH-CLAMP	55
4.1.1 Plataforma Ionflux™-16	57
4.1.2 Placas	57
4.1.3 Software	58
Organización del experimento o <i>Setup</i>	59
Ejecución del experimento	63
Obtención de datos crudos o <i>DATA ANALYZER</i>	64

4.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	66
4.2.1 Células y Soluciones	66
4.2.2 Protocolos de registro y análisis de resultados	68
<i>Prime</i>	69
<i>Trap</i>	69
<i>Break</i>	70
<i>Data Acquisition</i>	70
5 QUÍMICOS	76
5.1 Lidocaína	76
5.2 TTX	76
5.3 Veratridina	78
5.4 ATX-II	79
5.5 NIHCC; National Institute of Health Clinical Collection	79
5.6 THC-CL1	81
RESULTADOS	83
1 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LAS LINEAS CELULARES	85
2 FLPR® POTENCIAL DE MEMBRANA	88
3 PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO DE MEDIDA IONFLUX™ Y ANÁLISIS	92
3.1 Protocolos de medida y cultivo celular	92
3.2 Factor Z	96
3.3 Controles	102
3.4 Método de análisis	108
4 CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS LÍNEAS CELULARES	112
4.1 Estudio electrofisiológico de las líneas celulares	112
4.2 Estudio farmacológico de las líneas celulares	118
5 CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO DE LA LIBRERÍA NIHCC	122
6 VALIDACIÓN DE LOS CANDIDATOS	130
7 THC-CL1	134
DISCUSIÓN	137
CONCLUSIONES	147
BIBLIOGRAFÍA	151
ANEXO I	169
ANEXO II	183
AGRADECIMIENTOS	209

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Superfamilia de canales iónicos dependientes de voltaje	6
Figura 2. Localización cromosómica de los canales Nav humanos	9
Figura 3 Estructura de un canal de sodio dependiente de voltaje	12
Figura 4. Propiedades funcionales de un canal Nav	13
Figura 5. Potencial de acción	
Figura 6. Locus q24.3 del cromosoma 2 humano	17
Figura 7. Locus q13.13 del cromosoma 12 humano	18
Figura 8. Estadios del Síndrome de Dravet y sus manifestaciones clínicas	27
Figura 9. Mutaciones puntuales en <i>SCN1A</i> en pacientes con epilepsia genética asociadaes	30
Figura 10. Técnica del <i>patch-clamp</i>	56
Figura 11. Placas de medida del equipo Ionflux-16™	58
Figura 12. Estructura molecular de la TTX	77
Figura 13. Expresión de ARN mensajero de Nav1.1 y Nav1.6 en líneas celulares y cerebelo de ratón	86
Figura 14. Registros de fluorescencia del ensayo FLPR® con las líneas HEKNav1.1wt y CHONav1.6wt	90
Figura 15. Actividad relativa de los canales por fluorometría	91
Figura 16. Factor Z para antagonistas con HEKNav1.1wt	98
Figura 17. Registros en el cálculo del factor Z con HEKNav1.1wt	99
Figura 18. Factor Z para antagonistas con CHONav1.6wt	100
Figura 19. Registros en el cálculo del factor Z con CHONav1.6wt	101
Figura 20. Gráficas preliminares de la subserie NGP 201-02 en HEKNav1.1wt y CHONav1.6wt	103
Figura 21. Efecto de DMSO 1% durante el curso del experimento para HEKNav1.1wt	104
Figura 22. Efecto de la lidocaína sobre los canales Nav	106
Figura 23. Efecto de la TTX sobre los canales Nav a estudio	106
Figura 24. Efecto de la veratridina sobre los canales Nav	107
Figura 25. Efecto de la ATX-II sobre los canales Nav	107
Figura 26. Efecto de la TTX sobre un canal de sodio y corriente residual	110
Figura 27. Efecto de los controles con el nuevo tratamiento de datos	111
Figura 28. Registros y curva IV de HEKNav1.1wt	113
Figura 29. Registros y curva IV de CHONa1.6wt	113
Figura 30. Registros y curva IV de HEK	114
Figura 31. Registros y curva IV de CHO. A) Registros de la corriente de sodio a distintos voltajes	114
Figura 32. Propiedades biofísicas de las líneas celulares CHO, CHONav1.6wt y HEKNav1.1wt	115

Figura 33. Dosis respuesta de TTX sobre HEKNav1.1wt	118
Figura 34. Dosis respuesta de TTX sobre CHONav1.6wt	119
Figura 35. Actividad relativa de los canales Nav1.1 y Nav1.6 frente a TTX en dosis-respuesta	120
Figura 36. Sensibilidad a TTX de HEKNav1.1wt y CHONav1.6wt121	
Figura 37. Diseño final de las placas Ionflux para el cribado de NIHCC	124
Figura 38. Efecto de un bloqueador irreversible sobre un canal de sodio	125
Figura 39. Efecto de una molécula en ambas líneas	126
Figura 40. Registro de Nav1.1 con Amlexanox en el "n2"	127
Figura 41. Esquema del proceso de cribado y selección de los 4 candidatos	129
Figura 42. Actividad relativa de HEKNav1.1wt frente a los candidatos en dosis respuesta	131
Figura 43. Actividad relativa de CHONav1.6wt frente a los candidatos en dosis respuesta	132
Figura 44. Actividad relativa de los canales Nav1.1 y Nav1.6 frente a THC-CL1 en dosis respuesta.	135

FIGURAS ANEXO I

Figura AI- 1. Interfaz de la ventana de diseño de placa	171
Figura AI- 2. Interfaz de los editores de presión y voltaje	171
Figura AI- 3. Interfaz del editor de presión	172
Figura AI- 4. Adición de compuestos	172
Figura AI- 5. Interfaz del editor de voltaje	173
Figura AI- 6. Interfaz del control del amplificador	173
Figura AI- 7. Interfaz de la gráfica ΔI vs. Tiempo y el analizador de eventos	174
Figura AI- 8. Gráficas I vs. Tiempo	174
Figura AI- 9. Subprotocolo de <i>Prime</i>	175
Figura AI- 10. Subprotocolo de <i>Trap</i> para HEK Y HEKNav1.1wt	176
Figura AI- 11. Subprotocolo de <i>Trap</i> para CHO Y CHONav1.6wt	176
Figura AI- 12. Subprotocolo de <i>Break</i> para las líneas HEK y HEKNav1.1wt	177
Figura AI- 13. Subprotocolo de <i>Break</i> para las líneas CHO y CHONav1.6wt	177
Figura AI- 14. Protocolos de presión durante la fase de <i>Data acquisition</i>	178
Figura AI- 15. Protocolos de medida para las curvas I-V, G/Gmax -V y I/Imax-V	179
Figura AI- 16. Protocolo de voltaje	180
Figura AI- 17. Protocolos de adición de compuestos para el cribado	181
Figura AI- 18. Protocolos de adición de compuestos para la dosis-respuesta	181

FIGURAS ANEXO II

Figura AII- 1. Cribado de NGP 104-01	187
Figura AII- 2. Cribado de NGP 104-02	188
Figura AII- 3. Cribado de NGP 104-03	189
Figura AII- 4. Cribado de NGP 104-04	190
Figura AII- 5. Cribado de NGP 104-05.	191
Figura AII- 6. Cribado de NGP 104-06	192
Figura AII- 7. Cribado de NGP 201-01	193
Figura AII- 8. Cribado de NGP 201-02	194
Figura AII- 9. Cribado de NGP 201-03	195
Figura AII- 10. Cribado de NGP 201-04	196
Figura AII- 11. Segunda vuelta para NGP 104-01 y NGP 104-02	197
Figura AII- 12. Segunda vuelta para NGP 104-03 y NGP 104-04	198
Figura AII- 13. Segunda vuelta para NGP 104-05 y NGP 104-06	199
Figura AII- 14. Segunda vuelta para NGP 201-01 y NGP 201-02	200
Figura AII- 15. Segunda vuelta para NGP 201-03 y NGP 201-04	201
Figura AII- 16. Tercera vuelta para los potenciales activadores de Nav1.1	202
Figura AII- 17. Registros con Olmesartan	203
Figura AII- 18. Registros con Miglitol	204
Figura AII- 19. Registros con Amlexanox	205
Figura AII- 20. Registros con HTMT	206

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Isoformas de la subunidad alfa humana de Nav y su distribución	10
Tabla 2. Modificadores de canales de sodio y su sitio receptor	11
Tabla 3. Isoformas de la subunidad beta humana de los canales Nav y su distribución	16
Tabla 4. Protocolo de PCR	50
Tabla 5. Secuencias de los cebadores, T _m y tamaño del transcrito	51
Tabla 6. Soluciones de trabajo	68
Tabla 7. Características de los canales Nav1.1 y Nav1.6	78
Tabla 8. Tamaño esperado de los transcritos amplificados mediante PCR	86
Tabla 9. Variables testadas durante la puesta a punto del método	93
Tabla 10. Factor Z para antagonistas con HEKNav1.1wt y CHONav1.6wt	101
Tabla 11. Parámetros biofísicos de las corrientes de sodio de las líneas celulares	116
Tabla 12. Comparativa de los parámetros funcionales de CHONav1.6wt	117
Tabla 13. Parámetros de la sensibilidad a TTX de HEKNav1.1wt y CHONav1.6wt	121
Tabla 14. Resumen de los 4 candidatos seleccionados	133

TABLAS ANEXO II

Tabla All- 1. Factor Z para Nav1.1	185
Tabla All- 2. Factor Z para Nav1.6	186

LISTADO DE ABREVIATURAS

ATP	Trifosfato de adenosina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIS	Segmento inicial del axón (<i>Axon Initial Segment</i>)
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropionico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASIC	Canal de sodio sensible a protones (<i>Acid-sensing ion channel</i>)
ATX-II	<i>Anemona Sulcata</i> Toxina II
BTX	Batracotoxina
Ca²⁺	Catión calcio
CACNA1A	Subunidad alfa del canal de calcio dependiente de voltaje 1A (<i>Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 A</i>)
Cav	Canal de calcio dependiente de voltaje
CHO	Línea celular de ovario de hámster chino (<i>Chinesse hamster ovary</i>)
D1-D4	Dominios del 1 al 4 del Nav
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido Etilendiaminotetracético
EGTA	Ácido etilen-glicol tetraacético
EEG	Electroencefalograma
EMA	Agencia Eruopea del Medicamento (<i>European Medicines Agency</i>)
EMG	Electromiograma
ENaC	Canal de sodio epitelial (<i>Epithelial sodium channel</i>)
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos <i>and Drug Administration</i>)
FS	Crisis febriles (<i>Febrile Seizures</i>)
G	Conductancia
GABA	Ácido gamma-aminobutírico

GEFS+	Epilepsia generalizada con crisis febriles plus <i>(Epilepsy with Febrile Seizures plus)</i>
Gmax	Conductancia máxima
HEK293	Línea celular de riñón embrionario humano <i>(Human Embryonic Kidney 293)</i>
HEPES	Ácido hidroxietil-piperazin-etanosulfónico
HTMT	Histamina trifluorometil toluidide
I	Intensidad de corriente
IC₅₀	Concentración para el 50% de inhibición
ILAE	Liga Internacional contra la epilepsia <i>(International League against Epilepsy)</i>
INGEMM	Instituto de Genética médica y Molecular del Hospital de la Paz de Madrid
Imax	Intensidad máxima de corriente
iPSCs	Células madre pluripotentes inducidas <i>(Induced Pluripotent Stem Cells)</i>
IV	Relación intensidad-voltaje
Kv	Canal de potasio dependiente de voltaje
LGSC	Canales de sodio activados por ligando <i>(Ligand-Gated Sodium Channels)</i>
Na⁺	Catión sodio
Nav	Canal de sodio dependiente de voltaje
NIHCC	Colección clínica del Instituto Nacional de Salud de USA <i>(National Institute of Health Clinical Collection)</i>
NKCC1	Cotransportador Na-K-Cl <i>(Na-K-Cl cotransporter)</i>
NMDA	N-metil-D-aspartato
PA	Potencial de acción
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino <i>(Phosphate Buffered Saline)</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa <i>(Polymerase Chain Reaction)</i>
RE	Retículo endoplasmático
S1-S6	Segmentos transmembrana del 1 al 6 del Nav
SCN	Canal de sodio <i>(Sodium Channel)</i>
SD	Síndrome de Dravet
SD	Desviación estandar <i>(Standar Deviation)</i>
SE	Status epiléptico
SEM	Error estándar de la media <i>(Standar Error Media)</i>

SMEI	Epilepsia mioclónica grave de la infancia (<i>Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy</i>)
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SUDEP	Muerte súbita por epilepsia (<i>Sudden Death by Epilepsy</i>)
Tm	Temperatura de hibridación de los cebadores (<i>Melting Temperature</i>)
TRPA1	Receptor de ankirina de potencial transitorio 1 (<i>Transient Receptor Potential Ankyrin 8</i>)
TRPM8	Receptor de melastina de potencial transitorio 8 (<i>Transient Receptor Potential Melastatin 8</i>)
TRPV1	Receptor vaniloide de potencial transitorio 1 (<i>Transient Receptor Potential Vanilloid 1</i>)
TTX	Tetrodotoxina
UTR-5'	Región no codificante del extremo 5' del ADN (<i>Untranslated region at 5'</i>)
V	Voltaje
V_{0.5}	Voltaje al que el 50% de los canales están abiertos
VGSC	Canales de sodio activados por voltaje (<i>Voltage-Gated Sodium Channels</i>)

RESUMEN

El Síndrome de Dravet es una de las 6.500-8.000 enfermedades raras reconocidas por la Organización Mundial de la Salud (ORPHA:33069). Es una encefalopatía grave, caracterizada por el comienzo, antes del primer año de vida, de convulsiones recurrentes, febriles y/o afebriles, hemiclónicas o generalizadas, (*status* epiléptico), en niños anteriormente sanos. Este cuadro inicial es seguido de múltiples convulsiones, generalmente resistentes a fármacos antiepilépticos, con retraso o parada del desarrollo cognitivo y psicomotor. Está catalogada como canalopatía ya que más del 80% de los pacientes presentan mutaciones con pérdida de función en un alelo del gen *SCN1A*, que codifica para la subunidad alfa del canal de sodio dependiente de voltaje Nav1.1. Una función disminuida altera severamente la corriente de sodio y por tanto el disparo del potencial de acción. Debido a que Nav1.1 está expresado en interneuronas inhibitorias GABAérgicas, mayoritariamente del hipocampo y cerebelo, la caída de la actividad, provoca hiperexcitabilidad por defecto de inhibición. Además, parece que, como mecanismo compensatorio, se aumenta la expresión y/o la actividad de Nav1.6, canal de las neuronas excitatorias de Purkinje del cerebelo, lo que contribuye a la ataxia.

El descubrimiento de la etiología genética del Síndrome de Dravet en 2001, sentó las bases para la búsqueda de tratamientos efectivos, principalmente paliativos, debido a la propia complejidad de los canales de sodio y las técnicas de electrofisiología. En esta tesis doctoral se ha realizado la puesta a punto de una técnica de medida que permite realizar *in vitro*, cribados de alto rendimiento de librerías de compuestos en una plataforma de electrofisiología automatizada. Como primera aproximación, se consideró que la búsqueda de activadores de la copia no mutada del Nav1.1 y bloqueadores de Nav1.6, mediante el reposicionamiento de fármacos podía ser el inicio para futuros ensayos de *drug discovery* para el Síndrome de Dravet. En primer lugar, se han caracterizado biofísica y farmacológicamente dos líneas celulares que expresan de forma estable los canales implicados. Los compuestos probados pertenecían a una librería de moléculas bioactivas (NIHCC) que, o son fármacos genéricos o han superado las fases I-III de ensayos clínicos, disminuyendo así el tiempo potencial de llegada a los pacientes en el caso de la obtención de resultados positivos. El

volumen de información obtenida obligó a centrarnos en los posibles activadores del Nav1.1, que no afectaran o bloquearan a Nav1.6. La dificultad de la búsqueda era esperable, ya que actualmente solo se conocen neurotoxinas que aumentan la actividad de los canales Nav. Se seleccionaron 4 posibles candidatos que parecían generar los efectos deseados, pero su validación en dosis-respuesta no mostró diferencias significativas en la actividad de los canales. Nuestros estudios justifican e indican que 3 de estos candidatos necesitarían ser estudiados en profundidad mediante técnicas manuales y así profundizar en la información sobre los posibles bloqueadores específicos de Nav1.6 como dianas farmacológicas. En resumen, la técnica de *patch-clamp* automático, que hemos puesto a punto, ofrece la posibilidad del cribado masivo de colecciones de compuestos para la búsqueda de un fármaco para el Síndrome de Dravet y por extensión de otras canalopatías.





INTRODUCCIÓN

1 CANALES IÓNICOS

Los canales iónicos son una superfamilia de proteínas integrales de membrana que, mediante difusión facilitada, permiten el paso de iones a través de las membranas celulares. Estos canales son complejos heteromultiméricos que constan de una subunidad transmembrana, formando el poro hidrofílico y una o varias subunidades auxiliares normalmente ancladas a membrana y a la subunidad principal. Encontramos canales iónicos en la membrana plasmática, que relacionan a la célula con el medio extracelular, en los orgánulos intracelulares (p. ej. Retículo sarcoplásmico, endosomas, lisosomas o mitocondrias) y en las uniones estrechas intercelulares en las que cada célula aporta un hemicanal.

De forma breve, las propiedades que permiten a estas proteínas cumplir su función son:

1. **La alta selectividad y especificidad iónica**, determinadas por las características de los aminoácidos y la anchura del poro del canal; así encontramos canales de sodio, potasio, cloro, calcio e hidrogeniones, aunque existen algunos canales inespecíficos. La facilidad para que un determinado ion pase a través de un canal lo mide la **conductancia iónica (g)**.
2. **La gran velocidad del flujo de iones** entre 10^6 y 10^9 moléculas por segundo.
3. No son poros estáticos abiertos sino **elementos dinámicos** en los que la apertura y cierre del canal se deben a cambios en su estructura terciaria (compuertas o *gates*) en respuesta a distintos estímulos. Los canales iónicos se pueden clasificar según el estímulo que provoque su apertura o **gating**, y tienen como mínimo tres estados conformacionales, cerrado, activo e inactivo.

Tipos de Canales iónicos según el estímulo al que responden:

Canales dependientes de voltaje: la apertura y cierre de los canales se produce en respuesta a cambios en el potencial eléctrico de la membrana plasmática. La subunidad alfa

del canal posee un sensor de voltaje formado por aminoácidos con carga positiva que se mueven ante el estímulo eléctrico (creando la llamada corriente de compuerta) lo que modifica la energía libre de la proteína y cambia la conformación tridimensional, abriéndose las compuertas.

Canales activados por ligando: estos canales se abren ante la asociación de un agonista con su receptor específico, pudiendo estar unido o no al canal.

Canales sensibles a mediadores intracelulares y segundos mensajeros: como proteínas quinasas, proteínas G, nucleótidos cíclicos, ATP, Ca²⁺, entre otros. Estos canales podrían incluirse dentro de los activados por ligando.

Canales que responden a estímulos físicos o químicos: como presión, temperatura, pH o luz.

Canales de fuga: de sodio y potasio, que abren y cierran espontáneamente y se encargan de restaurar el potencial de membrana de la célula.

Debido a su ubiquidad en todos los tejidos, la disfunción de los canales iónicos lleva un variado espectro de trastornos ^{1, 2}. Las alteraciones de la función de los canales iónicos se conocen como **canalopatías** y nos encontramos, por ejemplo, nondistrofias de músculo esquelético ³, implicaciones de transmisión de señales por canales de calcio en la metástasis de diversos tumores ⁴, muerte súbita ⁵, o una amplia variedad de canalopatías neurológicas como la epilepsia ⁶⁻⁸.

La mayoría de las mutaciones asociadas a estos trastornos son por cambio en algún aminoácido que afectan a la cinética del canal, aunque existen casos de mutaciones heredadas y reordenamientos cromosómicos que afectan a cualquier momento de la biogénesis del canal, incluyendo la transcripción, las modificaciones post- transcripcionales del ARNm, sobre todo el *splicing*, la traducción, el plegamiento y maduración en Retículo endoplásmico y Golgi, su tráfico hasta membrana y por supuesto su ensamblaje como canal funcional.

1.1 Canales iónicos dependientes de voltaje

La gran superfamilia de canales iónicos dependientes de voltaje comprende 143 miembros organizados en 7 familias según su homología genética y estructural. Así, nos encontramos canales activados por voltaje, selectivos de sodio, de calcio y de potasio, Nav, Cav y Kv (*voltage-dependent sodium, calcium and potassium channels*), CNG (*cyclic nucleotide-gated channels*), HCN (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-modulated channels*), TRPs (*transient receptor potential channels*), TCPs (*two-pore channels*), Kir (*inwardly rectifying potassium channels*), K2P (*two-pore motif potassium channels*), KCa (*calcium-activated potassium channels*). En todos los mamíferos estos complejos proteicos están formados por varias subunidades con distintas estructuras y funciones. Todos ellos constan de una subunidad transmembrana principal que forma el poro y posee la zona sensible a voltaje y otras subunidades auxiliares. La subunidad principal o poro, está formada en el caso de Kv, Kir, KCa, TRP, CNG y HCN por un tetrámero, los K2P y TCP formados por un dímero de 2 polipéptidos con dos dominios cada uno y en el caso de los Nav y Cav el poro está formado por una única proteína con 4 dominios, cada uno de ellos con 6 hélices TM (Fig. 1) (Revisado en Yu et al., 2009⁹).

En los seres superiores pluricelulares, todos estos canales forman parte de una coordinada red de transmisión de información entre células o tejidos que permite al organismo cumplir distintas funciones. Los encontramos mayoritariamente en células excitables como las neuronas o las células musculares y a ellas les debemos la secreción de hormonas, la interacción con el ambiente, el procesamiento de la información en el cerebro y que este envíe órdenes a tejidos periféricos como, por ejemplo, la contracción de un músculo. Además, en células no excitables, señales transientes de calcio, por ejemplo, son la clave para muchos eventos celulares como la expresión de genes o la división celular. La importancia de este grupo de proteínas para la fisiología y el desarrollo de los seres vivos convierte el estudio de sus estructuras y su funcionalidad en una diana clave para el desarrollo o aprovechamiento de moléculas bioactivas contra el dolor crónico, la arritmia o la epilepsia¹⁰⁻¹³

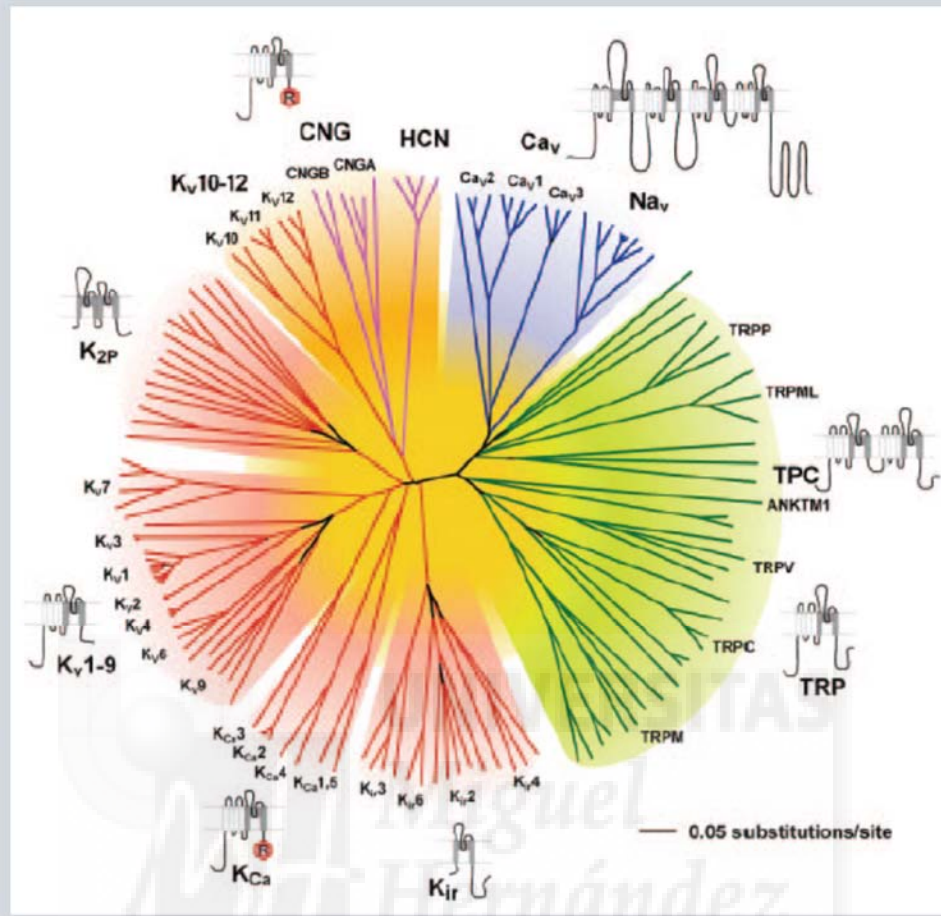


Figura 1. Superfamilia de canales iónicos dependientes de voltaje. La imagen muestra las 7 familias que forman la superfamilia de los canales iónicos dependientes de voltaje y su separación filogenética indicado como sustitución de pares de bases⁹.

1.2 Canales de sodio

Los canales de sodio, como ya se ha explicado, son un grupo de proteínas integrales de membrana que conducen iones de sodio a través de las distintas membranas de la célula. Se clasifican según el estímulo que abre el canal a dichos iones. Así tendremos canales de sodio activados por ligando (LGSC, *ligand-gated sodium channels*), canales de sodio sensibles, activados o dependientes de voltaje (Nav o VGSCs, *Voltage-gated sodium channels*) y canales de sodio de fuga o de reposo.

Aunque en esta tesis doctoral nos centraremos en Nav, canales de sodio dependientes de voltaje, en los que se profundizará en su estructura, mecanismo y función, se hará a continuación una breve revisión sobre otros tipos de canales de sodio.

Canales de sodio activados por ligando

Entre los LGSC, por ejemplo, los sensibles a acetilcolina y la superfamilia de ENaC-degenerina, descubiertos en los años 90, entre los que están las subfamilias de canales de sodio sensibles a protones, ASICs (*Acid-sensing ion channels*) y los canales de sodio epiteliales, ENaC (*Epithelial Na Channels*). ENaCs se encuentran mayoritariamente en riñón, pulmón, colon y algunas partes de los tractos reproductivos masculinos y femeninos. Estos canales son fundamentales para regular la homeostasis hídrica y la presión sanguínea, minimizar la pérdida de sodio en el filtrado glomerular y en las secreciones de organismos superiores del reino animal, o el transporte ciliar de los gametos en los conductos reproductivos^{14, 15}. Los ASICs, se expresan principalmente en el sistema nervioso central y periférico, en la médula ósea y en el tracto gastrointestinal. Diversos estudios han concluido que debido a su capacidad de despolarizar la membrana de células nerviosas y por tanto de generar potenciales de acción, juegan un papel fundamental en la plasticidad sináptica, mecanosensación, quimiosensación y la nocicepción¹⁶⁻¹⁸. Estas dos subfamilias de canales comparten una estructura común, con dos segmentos transmembrana y una parte extracelular bastante grande. Encontramos 5 genes parálogos en la mayoría de vertebrados, que codifican para los

5 canales ASICs (ASIC1-ASIC5) y 4 genes para las 4 subunidades de ENaC (α , β , γ , and δ). Parece que ENaC funciona siempre como heterotrímero de las subunidades α - β - γ o β - γ - δ ¹⁴, aunque algunos estudios apuntan a que pueden formar heterómeros de entre 4 y 9 subunidades; estas dudas quedarán solventadas cuando se consigan cristalizar estas proteínas (revisado en Kellenberger et al., 2015 ¹⁹). En cambio los canales ASICs pueden dar lugar a canales funcionales con un homo o heterotrímero de los 5 tipos, como se pudo comprobar en las primeras cristalizaciones de estas proteínas ^{20, 21}.

Canales de sodio dependientes de voltaje, Nav

Los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav), junto a los de Ca y K, son los responsables en mayor medida, de la generación y propagación de los potenciales de acción (PA) en células eléctricamente excitables como son neuronas y células musculares. La entrada de iones sodio es la responsable de la fase de despolarización de la membrana que desencadena el disparo de los PA. Pero además estos canales son fundamentales para la regulación de la organogénesis en el desarrollo del sistema nervioso central, como por ejemplo, la proliferación celular, crecimiento de neuritas, la señalización y la migración ²²⁻²⁴. Sabiendo esto es fácil predecir que la función anormal de los Nav esté vinculada a patologías relacionadas con la excitabilidad, tales como epilepsias, arritmias cardíacas o dolor neuropático. En los últimos años además, se ha visto que estos canales se expresan también en células consideradas tradicionalmente “no excitables” como fibroblastos, células del sistema inmunitario, glía e incluso células metastáticas ²⁵.

La familia de los Nav posee, en mamíferos, 10 isoformas de las cuales al menos 9 se expresan en el Sistema Nervioso, tanto en neuronas como en la glía, a excepción de Nav1.4 que es músculo-específico. Nav1.7, Nav1.8, Nav1.9 y Nav1.3, se expresan predominantemente en Sistema Nervioso Periférico, Nav1.4 en músculo esquelético adulto, Nav1.5 en músculo cardíaco. Los otros 4, Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3 y Nav1.6 son las isoformas mayoritarias del SNC, aunque en rata solo se ha encontrado ARNm embriónico y neonatal de Nav1.3 ^{26, 27} (Tabla 1).

Los Nav están formados por una subunidad alfa con muchas modificaciones postraduccionales, de aproximadamente 260 kDa, que se asocia con una o varias subunidades auxiliares beta de aproximadamente 23 kDa ²⁸. Así, las 10 isoformas de Nav poseen una subunidad alfa diferente, codificada por uno de los 10 genes parálogos conocidos como SCN_A (Sodium channel _alfa). Estos genes poseen al menos 20 exones cada uno y desde un punto de vista filogenético se pueden incluir en 4 grupos según el cromosoma en el que se encuentren. En los 4 casos, el locus donde se encuentran los genes de Nav contienen también un clúster de genes *HOX*, que codifican para factores de transcripción implicados en el control del desarrollo ²⁹.

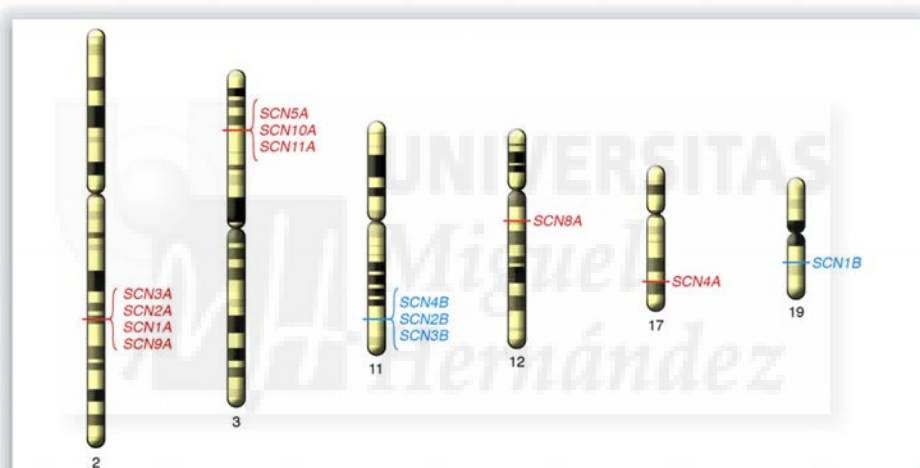


Figura 2. Localización cromosómica de los canales Nav humanos. Localización cromosómica humana de los genes que codifican para las subunidades alfa, en rojo, y las subunidades auxiliares beta, en azul, de los canales de sodio dependientes de voltaje ³⁰.

Como se resume en la figura 2 y en la tabla 1, encontramos un clúster en el cromosoma 2 para *SCN1A*, *SCN2A*, *SCN3A* y *SCN9A*, con alta similitud en secuencia, características biofísicas y sensibilidad a la neurotoxina Tetrodotoxina. En el cromosoma 3 encontramos *SCN5A*, *SCN10A* y *SCN11A*, que, aunque comparten el 75% de la secuencia, ciertos cambios puntuales les confieren distinta sensibilidad a TTX. *SCN4A* y *SCN8A* se encuentran en diferente cromosoma, 12 y 17 respectivamente, pero comparten un 85% de homología y similar

INTRODUCCIÓN

sensibilidad a TTX. Para el Nav atípico, SCNxA, localizado en el cromosoma 2 cerca del clúster anteriormente citado, no se conoce su sensibilidad a TTX^{30, 31}.

Tabla 1. Isoformas de la subunidad alfa humana de Nav y su distribución. (Adaptado de Clare et al., 2000; Goldin, 2001; Mantegazza et al. 2012; Vacher et al., 2008^{27, 32-34})

Proteína	Gen	Cromosoma	Tejidos	Localización subcelular	TTX IC ₅₀
Nav1.1	SCN1A	2q24.3	Cerebro, espina dorsal	Soma, dendritas, algún axón	5-10 nM
Nav1.2	SCN2A	2q24.3	Cerebro, espina dorsal	Axón	10-16 nM
Nav1.3	SCN3A	2q24.3	Cerebro (embriónico en rata)	Soma, dendritas	3-6 nM
Nav1.6	SCN8A	12q13.13	Cerebro, espina dorsal, glia, DRGs	Axón, Somatodendritas	2-10 nM
Nav1.4	SCN4A	17q23.3	Músculo esquelético		5 nM
Nav1.7	SCN9A	2q24.3	DRGs, células neuroendocrinas		25 nM
Nav1.5	SCN5A	3p22.2	Músculo cardiaco, Cerebro		2 µM
Nav1.8	SCN10A	3p22.2	DRGs y trigémino		60 µM
Nav1.9	SCN11A	3p22.2	DRGs y trigémino		1 µM
Nav1.x	SCN6A	2q24.3	Corazón, útero, pulmón, DRGs		

Todas las isoformas, al ser expresadas en sistemas heterólogos, generan corrientes de sodio con propiedades altamente conservadas a diferencia de otras familias de canales³⁵, aunque las pequeñas diferencias de esas propiedades contribuyen a su especialización en la fisiología, farmacología y patologías relacionadas³¹. Así, según se ha visto antes, la resistencia a TTX de los canales codificados en el cromosoma 3 presentan la sustitución de un único aminoácido; un residuo no aromático en la posición 401 en los TTX-resistentes a diferencia de un anillo aromático en los TTX-sensibles (Revisado en Lu et al., 2008)³⁶.

Tabla 2. Modificadores de canales de sodio y su sitio receptor. (Adaptado de Wang et al. , 2003³⁷)

Sitio Receptor	Molécula	Efecto fisiológico	Localización en Nav
1	Tetrodotoxina, Saxitoxina, μ -conotoxina	Inhibición de la permeabilidad a Na ⁺	Lazo P de D1, D2, D3 y D4
2	Batracotoxina, Veratridina, Aconitina, Grayanotoxina	Activación persistente, Despolarización del potencial de reposo, Disparos repetitivos del PA	D1-S6 D2-S6 D3-S6 D4-S6
3	α -toxinas de escorpión Toxina II Anemona, Δ -atracotoxinas	Prolonga la apertura de Nav	D4: lazo S3-S4 D1: lazo S5-S6 D4: lazo S5-S6
4	B-Toxinas de escorpión	Cambios en la activación del gating, Disparos repetitivos del PA	D2: lazo S3-S4
5	Brevetoxinas, Ciguatoxinas	Cambios en la activación del gating,	D1-S6 D4-S5
6	δ -conotoxina	Prolonga la apertura de Nav	?
7	DDT, Piretroides	Activación persistente, Despolarización del potencial de reposo, Disparos repetitivos del PA	D1-S6 D2-S6 D3-S6
8	Toxina de <i>Conus striatus</i>	Prolonga la apertura de Nav	?
9	Anestésicos locales, Anticonvulsivos, Antiarrítmicos, antidepresivos	Inhibición de la permeabilidad a Na ⁺	D1-S6 D3-S6 D4-S6

Ya que una pequeña variación en el *gating* y la cinética del canal puede tener grandes consecuencias en la excitabilidad de las membranas, los canales de sodio son diana de gran variedad de neurotoxinas naturales y de moléculas terapéuticas basadas en ellas, aunque de estas últimas solo se han obtenido bloqueadores.

Así encontramos neurotoxinas reversibles e irreversibles, modificadoras del *gating* que causan convulsiones, parálisis, fallo respiratorio y muerte, y fármacos que bloquean reversiblemente la conductancia de sodio o estabilizan el estado inactivado. En la tabla 2 se muestra un resumen de los 9 tipos de modificadores de canales de sodio de acuerdo a su sitio receptor³⁷.

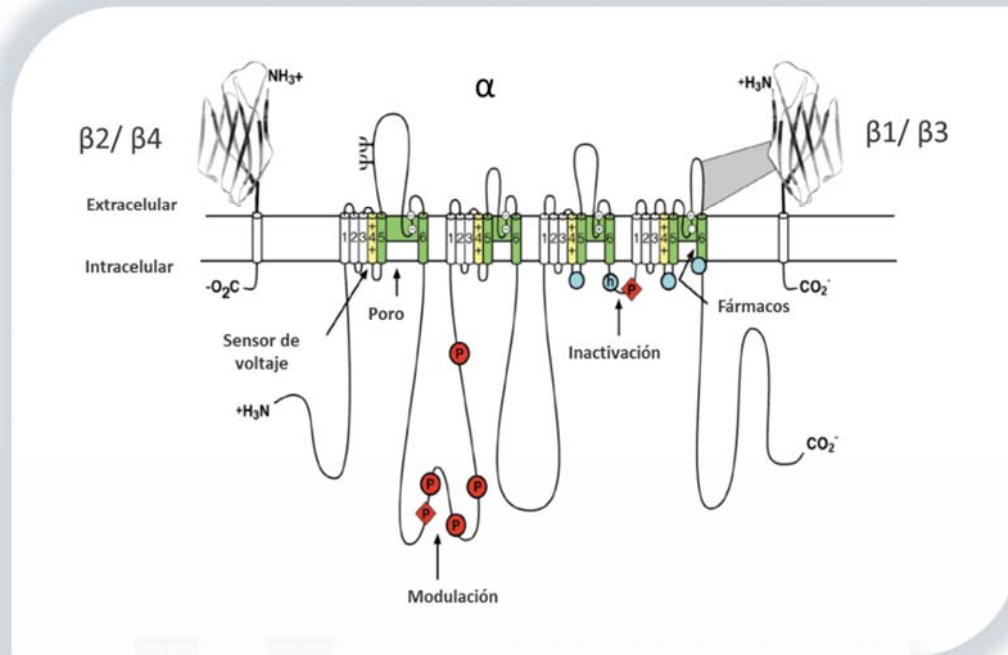


Figura 3 Estructura de un canal de sodio dependiente de voltaje. Se muestra la subunidad α en la que los cilindros representan los segmentos α -hélices. Se identifican 4 dominios con 6 segmentos cada uno. Sitios Y, de glicosilación. Sitios P, de fosforilación, por PKA en círculos y PKC en diamantes. S5 y S6 en verde, forman el poro. S4 en amarillo, es el sensor de voltaje. Residuos con círculos blancos exteriores, anillo EEEE e interiores anillo DEKA, que confieren la selectividad iónica y el sitio de unión a TTX. En azul, "inactivation gate" o motivo IFM. Extracelular aparecen las subunidades auxiliares $\beta 1/ \beta 3$ con interacción no covalente y $\beta 2/ \beta 4$. (Adaptado de Caterall, 2000²⁸)

La subunidad alfa del Nav es un complejo formado por aproximadamente 2000 aminoácidos organizados en cuatro dominios (D1-D4), con 6 segmentos α -hélice transmembrana por dominio (S1-S6, de 19 a 27 aminoácidos) (Fig. 3). Tanto los lazos de unión entre dominios, como los extremos C y N terminal de la proteína, son citoplasmáticos. El poro del canal está formado por los segmentos S5-S6 y el segmento que los une, el lazo P, posee los aminoácidos responsables de la conductancia y la selectividad al sodio ³¹. Este filtro de selectividad iónica está formado por el locus "DEKA" (aspártico, glutámico, lisina y alanina en DI, DII, DIII y DIV, respectivamente) siendo este también el sitio de unión de TTX ^{38, 39} y otro anillo externo "EEEE" (cuatro residuos de glutámico, uno por dominio)⁴⁰. La sustitución del locus "DEKA" por "EEEE" provocan un cambio en la selectividad iónica confiriendo selectividad al catión calcio ⁴¹. La mayor parte de los residuos de los segmentos transmembrana, como

cabría esperar, son hidrofóbicos, excepto en el segmento S4, en el que uno de cada tres residuos está cargado positivamente (argininas y lisinas), conformando el sensor de voltaje. Estos residuos cargados permanecen estabilizados durante el estado de reposo y durante la despolarización se desplazan en espiral con el campo eléctrico transmembrana según el modelo de “*sliding hélix*” o “*hélix screw*”^{42, 43}, lo que provoca un cambio conformacional en S5 y S6 facilitando la apertura del canal y la entrada de sodio^{44, 45}. Aproximadamente tras 0.5 ms, el *loop* intracelular entre DIII y DIV o motivo IFM (Ile-Phe-Met), conocido como “*inactivation gate*”, bloquea el poro previniendo el flujo de iones^{31, 46}. El canal inactivo transiciona a uno de varios estados cerrados, termodinámicamente indistinguibles, que puede responder de nuevo a cambios en el potencial de membrana (Fig.4)⁴⁷.

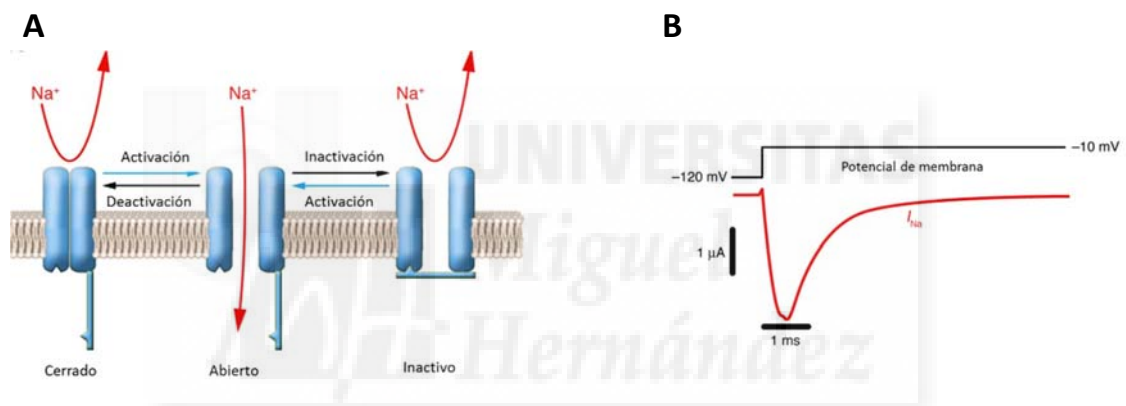


Figura 4. Propiedades funcionales de un canal Nav. A) Representación esquemática de las transiciones de gating de un canal Nav. B) Registro de corriente típica de un canal Nav respecto al tiempo con un potencial de membrana fijado. La línea roja corresponde al pico de corriente por entrada de sodio. (Adaptado de George, 2005³⁰)

Este es el mecanismo responsable para el disparo y el desplazamiento del potencial de acción en células excitables que se representa en la figura 5. La membrana plasmática, en ausencia de estímulos externos, se encuentra en un potencial de reposo de -70 mV y ante una despolarización repentina de este valor, por ejemplo, por la llegada de otro potencial de acción, se incrementa de forma inmediata la conductividad de los canales de sodio, g_{Na} , (Activación), es decir, aumenta su permeabilidad local despolarizando aún más la membrana (Ciclo Hodgkin de retroalimentación positiva). Si el estímulo externo es de suficiente magnitud y se supera el voltaje umbral de -55mV, este aumento regenerativo del potencial de

INTRODUCCIÓN

membrana, tiende al potencial de Nernst del Na^+ , llegando al pico del PA. El estímulo inicial activa también los canales de potasio, pero su cinética es mucho más lenta, así una vez se llega a la conductancia máxima de sodio, estos se inactivan, aumentando paulatinamente la conductancia del potasio, lo que repolariza la membrana. Este fenómeno se produce durante el tiempo suficiente para conseguir una hiperpolarización y con la caída de la conductancia de K^+ , la membrana regresa al potencial de reposo. Existe un periodo refractario, después del pico del potencial de acción, en el que los canales de sodio se encuentran inactivos y los de potasio aún están abiertos, en el que la membrana es insensible a nuevos estímulos hasta que los canales de sodio pasan al estado cerrado, momento en el que están preparados para el siguiente potencial de acción ^{48, 49}.

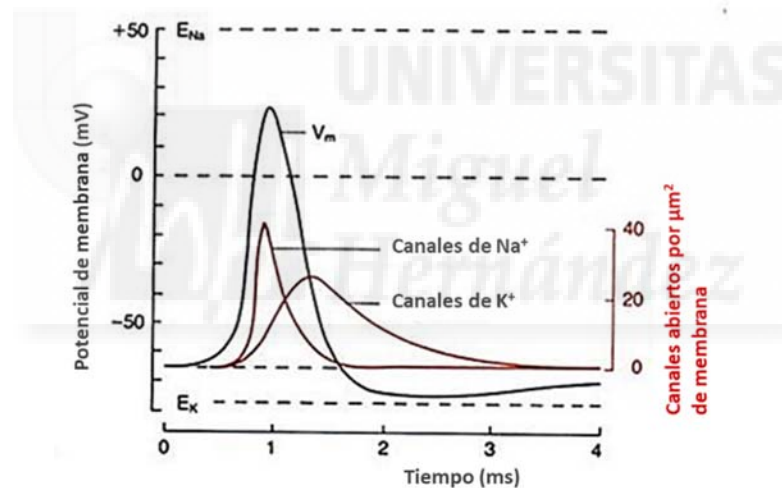


Figura 5. Potencial de acción. Representación de los valores del potencial de membrana de una célula excitable respecto del tiempo que dibuja el perfil típico de un potencial de acción generado por corrientes de sodio y de potasio. Se indica el número de canales abiertos por μm^2 en una región concreta de la membrana. (Adaptado de Lamberti et al., 2007⁵⁰)

Aunque el primer mecanismo de regulación de los canales Nav es la apertura y cierre voltaje-dependiente en una escala de tiempo de milisegundos, los canales de sodio cerebrales Nav1.1 y Nav1.2 están también regulados por dopamina, acetilcolina, serotonina y otros neurotransmisores que actúan a través de receptores acoplados a proteínas G que activan a

proteínquinasa A y C. Estas quinasas fosforilan los sitios del *loop* intracelular que conecta DI y DII y el del motivo IFM favoreciendo la inactivación lenta intrínseca del canal y por tanto reduciendo la corriente de sodio (Fig. 4). Parece que el mecanismo es muy similar al que se da en otros Nav, por ejemplo Nav1.7 o Nav1.8, aunque el efecto es el opuesto, contribuyendo a una sobreactivación en estados de hiperalgesia (Revisado en Cantrell et al., 2001⁵¹).

Aunque la subunidad alfa es suficiente para construir un canal funcional en sistemas heterólogos⁵², está ampliamente demostrado que se requiere la coexpresión de las subunidades auxiliares beta para obtener las propiedades nativas, ya que influyen en su cinética y *gating*³¹.

Las subunidades α del canal Nav están asociados a unas subunidades auxiliares designadas $\beta 1$ - $\beta 4$ ⁵³⁻⁵⁶ codificadas por los genes *SCN1B*, en el cromosoma 19, y *SCN2B*, *SCN3B* y *SCN4B*, en el cromosoma 11, y una variante de *splicing* de la subunidad $\beta 1$, conocida como $\beta 1A$ o $\beta 1B$ según los autores⁵⁷⁻⁵⁹ (Fig. 2) (Tabla 3). Se cree que la mayoría de los canales cerebrales están asociados mediante enlaces débiles a las subunidades $\beta 1$ y $\beta 3$ y covalentemente a través de puentes disulfuro con $\beta 2$ y $\beta 4$ ⁶⁰ (Fig. 3).

Las betas son moléculas de adhesión celular que podrían tener un papel importante en la interacción de los canales con otras estructuras celulares y su correcta integración en los dominios subcelulares⁶¹. La subunidad $\beta 1$ ha sido la más ampliamente estudiada. Pertenece a la gran familia de las inmunoglobulinas de moléculas de adhesión celular (CAMs), media la agregación celular, el reclutamiento del citoesqueleto así como la interacción con la matriz extracelular y por tanto con el medio^{22, 62, 63}. Además, $\beta 1$ y $\beta 3$ modulan la cinética y el *gating* del canal y la glicosilación de la subunidad alfa así como su tráfico desde retículo endoplásmico hasta la expresión en la membrana^{23, 55}. Ratones *knock-out Scn1b* presentan signos de ataxia, crisis epilépticas espontáneas y un prolongado intervalo QT, lo que indica que la subunidad $\beta 1$ modula la transmisión del impulso eléctrico *in vivo*^{64, 65}. Esto ha sido corroborado al descubrir la presencia de mutaciones en el gen que codifica para esta subunidad en pacientes diagnosticados con algunos tipos de síndromes epilépticos (*SCN1B*, *SCN2B*, *SCN3B*), arritmias

INTRODUCCIÓN

(*SCN1B*, *SCN2B*, *SCN3B*) e incluso Síndrome de Brugada y QT largo (*SCN1B*, *SCN4B*) o Enfermedad de Huntington ⁶⁶⁻⁷².

Tabla 3. Isoformas de la subunidad beta humana de los canales Nav y su distribución.

(Adaptado de Patino et al., 2009; Brackenbury et al., 2011; Caterall, 2012. ^{69, 73, 74})

Proteína	Gen	Cromosoma	Tejidos	Efecto en la función de α
$\beta 1$	SCN1B	19q13.1	SNC, SNP, glía, músculo cardíaco y esquelético	Tráfico y gating
$\beta 1A/\beta 1B$	SCN1B	19q13.1	Glándula adrenal, neuronas corticales, células de Purkinje núcleo cerebelar profundo, DRGs, asta ventral, músculo cardíaco y esquelético	Tráfico y gating
$\beta 2$	SCN2B	11q23	SNC, SNP, músculo cardíaco	Tráfico
$\beta 3$	SCN3B	11q.23.3	Glándula adrenal, SNC, SNP, músculo cardíaco, riñón	Tráfico y gating
$\beta 4$	SCN4B	11q23.3	SNC, SNP, músculo cardíaco y esquelético	Tráfico

1.2.1 SCN1A

Fue en 1994 la primera vez que se identificó y mapeó mediante FISH (*Fluorescence in situ hybridization*) el gen *SCN1A* en la banda 2q23-24 del cromosoma 2. Este gen se encontraba en el mismo locus que otro canal de sodio, el *SCN2A* ⁷⁵, lo que apuntaba a que formaban un clúster, igual que el localizado en ratón ⁷⁶ y esto era importante desde el punto de vista evolutivo. Hoy en día sabemos que en este clúster encontramos 8 genes 5 de los cuales codifican para distintas isoformas de la subunidad alfa de Nav (Fig. 6) ⁷⁷. Su secuencia de 20807 pares de bases está repartida en 31 exones, de los cuales, 5 se incluyen en la región UTR- 5' ⁷⁸. Su transcrito sufre modificaciones de *splicing* codificando para una proteína de 2009 aminoácidos.



Figura 6. Locus q24.3 del cromosoma 2 humano. Se muestran los genes localizados en el locus q24.3 del cromosoma 2 humano, el perfil de exones e intrones de cada uno de ellos y el sentido de la transcripción. Entre las proteínas codificadas se encuentran 5 isoformas de la subunidad alfa de los canales de sodio sensibles a voltaje (Adaptado de Meisler et al., 2010⁷⁷).

Estudios de inmunohistoquímica revelan que el Nav1.1 se expresa en todas las áreas del cerebro, hipocampo, cerebelo y cortex, mayoritariamente en el soma y dendritas aunque también aparece en el AIS (*Axón Initial Segment*)^{27, 79}. Desde el punto de vista funcional, estudios con ratones *Scn1a*^{+/-} y *Scn1a*^{-/-} revelan que este canal se encuentra en las interneuronas inhibitorias del hipocampo, corticales y cerebelo, por lo que son el punto de control de la hiperexcitabilidad neuronal⁸⁰.

Nav1.1 comienza a expresarse en rata a partir del día posnatal 7, lo que se extrapola a los 6 meses en humanos, y aumenta su expresión hasta permanecer inalterada durante la edad adulta²⁶.

Variantes genéticas de SCN1A se han relacionado con una gran familia de epilepsias, como se explicará más adelante, pero también con migraña hemipléjica familiar, que puede cursar con o sin epilepsia^{34, 81, 82}.

1.2.2 SCN8A

El gen *SCN8A* codifica para la subunidad alfa del canal de sodio dependiente de voltaje Nav1.6. En 1995 fue identificado por primera vez su homólogo de ratón⁸³ y se aisló ARNm de su homólogo en rata⁸⁴. El gen humano fue mapeado en 1998 y localizado en el cromosoma

INTRODUCCIÓN

12q13 (Fig. 7), distribuido en 28 exones, estando su transcrito controlado y modificado por *splicing* alternativo neuroespecífico, que da lugar a una proteína de 1980 aminoácidos ⁸⁵⁻⁸⁷

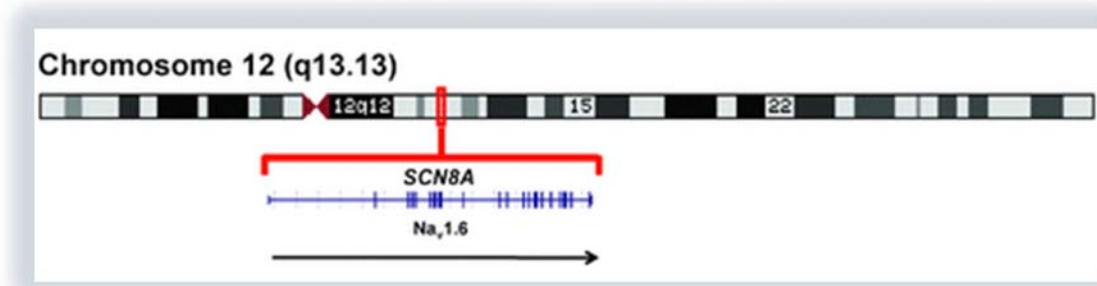


Figura 7. Locus q13.13 del cromosoma 12 humano. Se muestra el gen *SCN8A*, que codifica para la subunidad alfa del canal de sodio Nav1.6 localizado en el locus q13.13 del cromosoma 12 humano con la secuencia de exones e intrones y el sentido de la transcripción (Adaptado de Meisler et al., 2010 ⁷⁷).

Nav1.6 es un canal que se concentra en el segmento inicial del axón y los nodos de Ranvier de axones mielinizados de células granulares y piramidales del cerebelo y del hipocampo, aunque también se ha encontrado en dendritas y el soma neuronal en células cerebelares de Purkinje ⁸⁸⁻⁹¹. Parece que durante el desarrollo el Nav1.2, isoforma predominante en axones no mielinizados, se encuentra en los nodos inmaduros y es sustituido por el Nav1.6 una vez que la mielina los recubre ⁹². Este cambio de isoforma durante el desarrollo parece crítica ya que ratones *Scn8a*^{-/-} muestran excitabilidad descompensada con disfunción motora, ataxia, y muerte a día P21, lo que apunta a que sea fundamental para los potenciales de acción del alta frecuencia ⁹³.

Se han asociado mutaciones homocigotas con pérdida de función del Nav1.6 e hipoexcitabilidad con discapacidad intelectual en humanos ^{94, 95} o comportamientos de ansiedad sin convulsiones espontáneas en ratones ⁹⁶. En cambio, otras de pérdida de función que provocan hiperexcitabilidad por incremento de las corrientes persistentes se ha visto que causan encefalopatía epiléptica infantil y muerte súbita. Podría resumirse en que mutaciones que causan hiperexcitabilidad pueden causar epilepsia y las que cursan con hipoexcitabilidad llevarían a discapacidad intelectual⁹⁷.

2 EPILEPSIA Y EPILEPTOGÉNESIS

La epilepsia es un trastorno clínico común, con una prevalencia de 4-8 % y que suele ser más frecuente en la primera infancia y en la senectud.

Según la **Organización Internacional contra la epilepsia** (*International League Against Epilepsy, ILAE*) y la **Agencia Internacional para la Epilepsia** (*International Bureau for Epilepsy, IBE*)⁹⁸:

- ✓ **Crisis epiléptica:** Conjunto de signos y/o síntomas que ocurren de forma transitoria como resultado de una actividad anormal excesiva y sincrónica de las neuronas cerebrales. Según la zona del cerebro afectada se mostrará de forma diferente.
- ✓ **Epilepsia:** Desorden cerebral caracterizado por una predisposición subsistente a generar crisis epilépticas y por las consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales derivadas de ello. La definición de epilepsia requiere la ocurrencia de al menos una crisis.
- ✓ **Epileptogénesis:** es la secuencia de eventos que convierten un circuito neuronal normal en un circuito hiperexcitable.

El organismo encargado de clasificar y dar nombre a todos los tipos de epilepsias o crisis epilépticas conocidas es la Comisión para la Clasificación y Nomenclatura de la Organización Internacional contra la Epilepsia (*Commission on Classification and Terminology of the International League against Epilepsy, ILAE*). La estandarización de los criterios diagnósticos es fundamental para epileptólogos, neurólogos y neuropediatras. Aunque en los últimos años se han ampliado las investigaciones y conocimientos en este campo y se han propuesto revisiones y nuevas clasificaciones ^{99, 100}, se sigue utilizando mayoritariamente las clasificaciones iniciales de la ILAE de 1981 y 1989 ^{101, 102}.

Así, la clasificación de las crisis epilépticas se basa en la identificación del conjunto de manifestaciones patológicas (signos y síntomas) y el estudio del electroencefalograma y establece la siguiente división:

- **Crisis parciales o focales:** Afectan a un único hemisferio o lóbulo del cerebro. Según se vea afectada o no la consciencia, encontramos:
 - **Crisis simples parciales:** El estado de consciencia permanece intacto. Dependiendo de a qué zona del cerebro se deba, los afectados sienten sensaciones u olores extraños, presentan sacudidas que suelen comenzar en un grupo de músculos (p.e. un brazo) y se extienden a otro (p.e. la pierna) lo que se llama marcha jacksoniana. Usualmente saben que algo está sucediendo y son capaces de recordar la crisis.
 - **Crisis complejas parciales:** El nivel de consciencia se ve afectado, o con pérdida completa o disminuyendo la capacidad de respuesta. No son capaces de recordar lo sucedido.
- **Crisis Generalizadas** (convulsivas o no convulsivas): Ambos hemisferios del cerebro. En ocasiones comienzan siendo crisis parciales que se extienden llamándolas en este caso crisis generalizadas secundarias.
 - **Crisis de ausencias:** Son más frecuentes en niños y se caracterizan por una breve pérdida de conocimiento, con mirada ausente, con o sin sutiles movimientos como parpadeo de ojos, morder los labios o masticar. Normalmente, estos niños pueden tener un crecimiento normal, sin necesidad de tratamiento.
 - **Crisis Tónicas:** Contracción simultánea y mantenida de todos los músculos.
 - **Crisis Atónicas:** Se producen caídas súbitas por pérdida de la fuerza muscular, usualmente sin pérdida de consciencia.
 - **Crisis Clónicas:** Los músculos sufren contracciones y relajaciones rítmicas, siendo los del cuello, cara, brazos y piernas los más comúnmente afectados.
 - **Crisis Mioclónicas:** Espasmos musculares cortos, uno o dos segundos, de un grupo de músculos.

- **Crisis Tónico-Clónicas:** Es lo que usualmente conocemos como crisis convulsivas. Son las más comunes y, por sus características, también las más dramáticas. La persona sufre rigidez mantenida y sacudidas musculares, con pérdida repentina de la consciencia y a menudo pérdida del control de esfínteres. Una crisis tónico-clónica de más de 5 minutos se conoce como *Status Epiléptico* y es una emergencia médica que requiere tratamiento inmediato.
- **Crisis no clasificables:** crisis neonatales, movimientos rítmicos oculares, movimientos de masticación, etc.

La clasificación de las epilepsias se establece en base al tipo de crisis y a su etiología. Así nos encontramos epilepsias focales, generalizadas, indeterminadas y síndromes especiales que pueden ser idiopáticas (no atribuibles a otra enfermedad y en la que se presume un origen genético), sintomáticas (de etiología conocida) o criptogénicas (en las que se sospecha causa aunque esta no pueda ser determinada)^{101, 102}.

De una forma fácilmente entendible, podemos catalogar las epilepsias en **adquiridas** (por un traumatismo, tumor, derrame cerebral, infección, defecto de nacimiento, etc.) y las de **origen genético** que pueden ser debidas a mutaciones en un solo gen (<2%), a múltiples genes más la influencia ambiental (más de 200 genes conocidos implicados, por ejemplo, canales iónicos, receptor GABA, etc.) y otros desórdenes genéticos con alteraciones cerebrales o trastornos metabólicos en los que la epilepsia es uno de los primeros síntomas (Síndrome de Down, Síndrome de Angelman, Síndrome de Dravet, etc.).

Desde el punto de vista fisiopatológico, las crisis epilépticas son episodios de descarga de impulsos eléctricos de alta frecuencia por parte de un grupo de neuronas. Esto puede deberse a un exceso de transmisión entre neuronas excitatorias o un defecto de la funcionalidad de neuronas inhibitorias. Estudiando este hecho desde el punto de vista molecular sabemos que cuando el potencial de acción llega al final del axón de las neuronas excitatorias o Glutamatérgicas, la entrada de Na^+ y Ca^{2+} provoca la despolarización responsable de la exocitosis de vesículas de glutamato al espacio presináptico, activando dos receptores en la neurona postsináptica, el NMDA, que permite el paso de Ca^{2+} y el AMPA, que permite el paso

de Na⁺. Esta entrada de iones positivos al interior de la neurona, provoca una despolarización que es la responsable de la apertura de canales de sodio dependientes de voltaje y por tanto del disparo del potencial de acción transmitiendo el impulso nervioso a través del axón hasta la siguiente neurona. Este proceso de excitación en serie debe ser equilibrado por las neuronas inhibitorias o GABAérgicas, cuyo neurotransmisor, GABA, se une a su receptor en la neurona postsináptica que una vez abierto permite la entrada de iones cloro, hiperpolarizando de nuevo el interior del soma y evitando el disparo del potencial de acción.

La farmacología para el tratamiento de las epilepsias se puede dividir en tres grupos dependiendo de que punto del proceso sináptico regulen ¹⁰³:

- ✓ **Moduladores de canales iónicos dependientes de voltaje:** Principalmente bloqueadores de canales de sodio y calcio.
- ✓ **Aumento de la sinapsis inhibitoria:** Aumentando la actividad de GABA, el principal neurotransmisor inhibitorio, favoreciendo su liberación e impidiendo su recaptación.
- ✓ **Inhibición de la sinapsis excitatoria:** Disminuyendo la actividad de glutamato, principal neurotransmisor de neuronas excitatorias.

3 SÍNDROME DE DRAVET

En 1978, fue la primera vez que la psiquiatra y epileptóloga francesa Charlotte Dravet describió la Epilepsia Mioclónica Severa de la Infancia, SMEI (*Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy*). Hasta ese momento el Síndrome de Lennox-Gastaut (LGS) era considerado el síndrome epiléptico más común y severo en los primeros años de vida ¹⁰⁴. Este síndrome se manifestaba con episodios de *status* epiléptico, caídas repentinas, farmacoresistencia y discapacidad intelectual ¹⁰⁵. La Dra. Dravet percibió que algunos niños diagnosticados como LGS presentaban además crisis mioclónicas masivas, fotosensibilidad y crisis convulsivas febriles en el primer año de vida. Así, decidió diferenciar estos casos como SMEI. Tras publicarse por primera vez en Francia ¹⁰⁶, se reconoció en 1983 por la Organización Internacional contra la Epilepsia (ILAE) ¹⁰⁷. En 1989, y debido a que más de la mitad de los casos de SMEI no presentaban crisis mioclónicas, la Comisión para la Clasificación y la Nomenclatura de la Epilepsia de la ILAE, decidió unificar a un grupo heterogéneo de síndromes epilépticos en el epónimo de Síndrome de Dravet en honor a su descubridora ¹⁰². Se incluían por tanto síndromes que, presentaban, convulsiones febriles o afebriles, crisis epilépticas generalizadas o unilaterales, con o sin crisis de ausencia, ataxia, ritmo circadiano alterado, hipersensibilidad lumínica. Todas ellas compartían el inicio de las crisis en el primer año de vida, retraso del desarrollo psicomotor a partir del segundo año y resistencia a cualquier forma de tratamiento. El descubrimiento de su etiología genética en el año 2000 por Claes et al. ¹⁰⁸ fue clave para el comienzo de la búsqueda del tratamiento adecuado, ya que la hiperexcitabilidad neuronal era debida a mutaciones con pérdida de función de la subunidad alfa del canal de sodio dependiente de voltaje *SCN1A* de neuronas inhibitorias. Hasta ese momento los pacientes eran erróneamente tratados con antiepilépticos comunes, como, por ejemplo, bloqueantes de canales de sodio y activadores de canales de potasio, que promovían la actividad de neuronas excitatorias, causándoles en la mayoría de los casos consecuencias letales.

3.1 Fenotipo

El Síndrome de Dravet es una de las consideradas enfermedades raras ya que se estima que la incidencia es de 1/15700 a 1/40000 basado en estudios demográficos en Dinamarca, Reino Unido y Estados Unidos ¹⁰⁹⁻¹¹¹. Un estudio realizado en España, por la Universidad de Navarra, indicó que los niños afectados por Dravet eran alrededor de un 1.4% de todos los niños con epilepsia ¹¹².

Charlotte Dravet describió tres estadios de la enfermedad, la fase febril, la fase de empeoramiento y la fase de estabilización, con manifestaciones clínicas características de cada una de ellas, como se resume en la figura 8 ¹⁰⁵.

- La **fase febril**, es la primera, y suficiente para un correcto pre-diagnóstico de la enfermedad, aunque el electroencefalograma (EEG) aún no muestra picos patológicos ¹¹³. Las primeras crisis aparecen dentro del primer año de vida, en bebés con un desarrollo normal y sin alteración neurológica aparente. Suelen desencadenarse, por “altas temperaturas”, mayores de 37,5 °C, como puede ser un baño caliente, un pico de fiebre o incluso post-vacunación. Muchos pacientes etiquetados inicialmente con “encefalopatía post-vacunación” han sido posteriormente diagnosticados con Dravet. Debido a la controversia del tema, diversos grupos han realizado estudios concluyendo que no es la vacunación la causa primera de las crisis, ni de la aparición de la enfermedad, y que las primeras crisis hubieran aparecido ante cualquier otra elevación de la temperatura sobre la fisiológica ^{114, 115}. Una vez que aparece la primera crisis, estas suelen tener una frecuencia variable, de origen hemiclónico y/o focal, rara vez mioclónicas masivas, y de más de 15 minutos, por lo que son consideradas de *status* epiléptico, SE, y deben ser tratadas como emergencia sanitaria. En los bebés, es muy difícil para padres y pediatras notar algún signo de retraso cognitivo, aunque los test apropiados podrían ya revelar problemas visuales de fijación y agudeza ¹¹⁶.

- La **fase de empeoramiento** se da entre los 12 meses y el quinto año de vida. En esta fase, las crisis motoras y la ataxia son más frecuentes, pero más cortas, siendo la causa más común la hipertermia, aunque también el ejercicio físico, las emociones, o incluso la luz. Se presentan crisis de ausencias y crisis parciales complejas con pérdida de consciencia. El EEG comienza a mostrar las ondas de alto voltaje y alta frecuencia típicas de las crisis convulsivas ¹¹³. Es, durante estos años, cuando se dan los SE más agresivos, los SE severos febriles, que pueden alargarse por horas o incluso días y que su etiología sigue siendo un reto. Estos SE son los causantes de daños en la corteza, los ganglios basales y la materia blanca cerebral debido a la isquemia, lo que provoca graves secuelas psicomotoras, como tetraparesia espástica y grave deficiencia cognitiva en los años posteriores ¹¹⁷. A partir del segundo año comienza a notarse la dificultad del habla, déficit de atención con hiperkinesia y comportamiento autista con bajo contacto visual en una cuarta parte de los niños afectados ¹¹⁸. Aunque parece que la edad en la que comienzan a andar no se ve afectada, una vez que los niños tienen autonomía para caminar solos se empieza a percibir la ataxia y las caídas repentinas sin sacudidas. Los electromiogramas (EMG), que registran la actividad eléctrica de los músculos esqueléticos, revelan la implicación de nervios motores periféricos afectados ¹¹⁹.
- La **fase de estabilización**, a partir del quinto año de edad, muestra, hasta el final de la primera década, las crisis no convulsivas con estado de obnubilación, en el que se unen la confusión con movimientos pseudorítmicos de las extremidades. En la edad adulta, son más comunes las crisis tónicas y tónico-clónicas, generalizadas, menos frecuentes, con una media de una crisis al año y que suelen darse durante el período de sueño. En esta fase las manifestaciones no epilépticas pasan a un primer plano, como son los problemas cognitivos y psicomotores. La comprensión del lenguaje y la socialización parece que se mantienen, a diferencia de funciones visoespaciales, la comunicación y la autonomía, que si se ven afectadas ^{120, 121}. Así se presentan signos de discapacidad intelectual severa,

persiste el espectro autista, la hiperkinesia se sustituye por movimientos más lentos y marcha agazapada, Parkinsonismo, problemas ortopédicos, infecciones respiratorias recurrentes o disfagia a partir de la cuarta década de vida ^{122, 123}. Como se ha comentado anteriormente, la prognosis de la enfermedad dependerá mucho de cómo haya cursado en los primeros años de vida, y un buen desarrollo cognitivo en la edad adulta está asociado con haber padecido menos de 3 episodios de SE en la infancia mientras que un EEG anormal en el primer año, los desórdenes motores, crisis tónicas y mioclónicas y ausencias tempranas auguran un peor pronóstico ¹¹⁶. Se han hecho estudios de seguimientos de la enfermedad a pacientes de entre 20 y 50 años, y aunque hay algún caso de autonomía e independencia, la gran mayoría padece un deterioro físico y cognitivo entre medio y severo ^{124, 125}.

El índice de mortalidad es alto, entre un 3,1 y un 20,8 % de los pacientes, con un pico entre los 3 y 7 años de edad ¹²⁶. Las 3 causas más comunes de muerte prematura son el SE, muerte accidental por daños durante las crisis, y la muerte súbita. Esta última es la manifestación más preocupante del síndrome de Dravet y de otras epilepsias y se conoce como SUDEP, *SUdden Death in EPilepsy*. Parece que el riesgo de SUDEP en Dravet es 15 veces mayor que en otras epilepsias, llegando a más del 56% de la tasa de mortalidad, con dos picos, entre 1 y 3 años y a partir de los 18 años, sin que haya habido evidencias de empeoramiento en los meses previos ^{105, 127}.

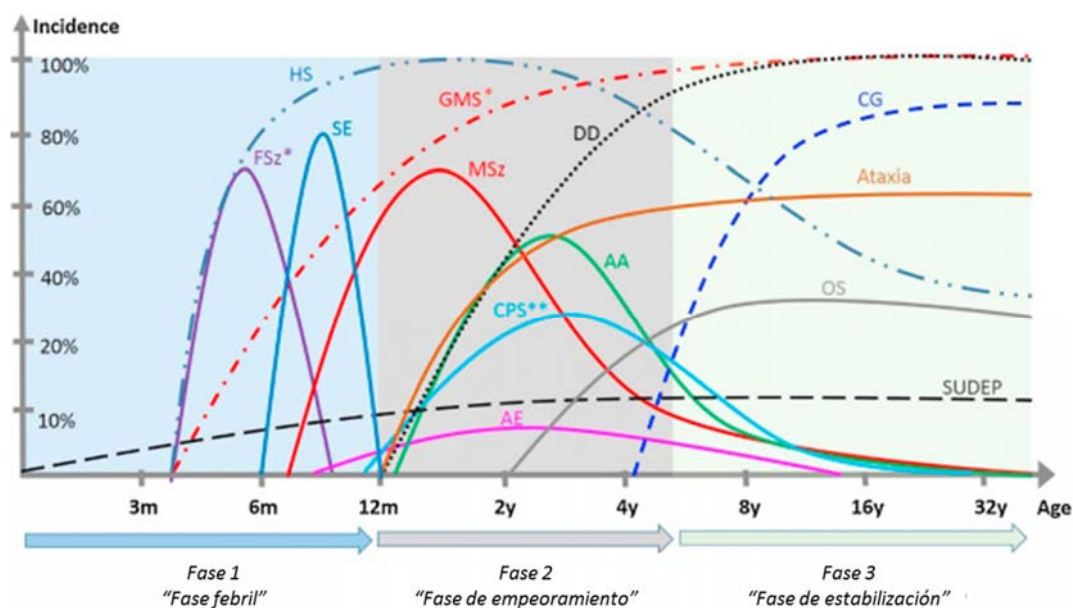


Figura 8. Estadios del Síndrome de Dravet y sus manifestaciones clínicas. FS, Crisis febriles complejas; HS, Sensibilidad hipertérmica; SE, Status epiléptico convulsivo; GMS, Crisis motoras generalizadas; MSz, Crisis Mioclónicas; AA, Ausencias Atípicas; CPS, Crisis parciales complejas; OS, Estado de obnubilación; AE, Encefalopatía aguda; DD, Retraso del desarrollo; CG, Marcha agazapada; Ataxia; SUDEP, Muerte súbita en epilepsia. Se observa la evolución de las manifestaciones típicas epilépticas en la primera década de vida a signos consecuencia de los continuos *status* epilépticos, con deterioro cognitivo y psicomotor. (Adaptado de Gataullina et al., 2016 ¹¹⁶).

3.2 Etiología genética

Dos grupos independientes determinaron en 1999 el ligamiento a un locus del cromosoma 2 de una epilepsia familiar conocida como GEFS+ (*Generalized Epilepsy with Febrile Seizures plus*) ^{128, 129}. En el año 2000, y gracias al estudio genético molecular de estas familias, se hallaron dos mutaciones diferentes asociadas al GEFS+, en el gen que codifica para *SCN1A*, subunidad alfa del canal de sodio dependiente de voltaje Nav1.1 ¹³⁰, y en 2001 Claes et al. concluyeron que, mutaciones en este mismo gen eran las causantes de un síndrome epiléptico conocido como SMEI (*Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy*) o Síndrome de Dravet ¹⁰⁸.

Desde entonces, más de 1250 mutaciones diferentes han sido identificadas en *SCN1A*, de las cuales, la mayoría se presentan *de novo* y un 75% las porta el cromosoma paterno ^{131, 132}.

Las mutaciones *de novo*, con una alta prevalencia en humanos, entre $7.6 - 22.8 \times 10^{-9}$, parecen estar implicadas en encefalopatías epilépticas severas y otros desórdenes neuropsiquiátricos como esquizofrenia, autismo o retardo mental ^{133, 134}. El origen de estas mutaciones *de novo* y en qué momento se producen está siendo ampliamente estudiado.

Hay estudios que han identificado mellizos, heterocigóticos, ambos diagnosticados con Síndrome de Dravet y mutaciones de proteína truncada o gemelos monocigóticos, uno afectado y otro no ¹³⁵, lo que da indicios de que la mutagénesis *de novo* puede darse en cualquier estadio del ciclo sexual, normalmente en los gametos parentales, pero también en el estadio inicial del embrión o incluso en desarrollo final del feto ⁸. El hecho de que la mayoría de estas mutaciones estén presentes en el cromosoma heredado del padre, podría deberse a que el número de divisiones celulares es mucho mayor en la espermatogénesis ^{136, 137}.

Además, el mosaïcismo genético, tanto somático como germinal, se baraja como la causa del 5% de estas mutaciones *de novo*. Se han encontrado casos de mosaïcismo somático, confinado al cerebro o al tejido neuroectodérmico, en síndromes esporádicos de malformación cerebral que presentan convulsiones y espectro epiléptico. En otros casos, se han encontrado que mutaciones catalogadas *de novo*, en realidad habían sido heredadas de padres asintomáticos con mosaïcismo genético, siendo también esta coexistencia de poblaciones celulares la causa probable de las diferencias de severidad fenotípica ante mutaciones similares en el Síndrome de Dravet ¹¹⁶.

Así, la gran mayoría de las mutaciones puntuales en *SCN1A* dan lugar a la gran familia de síndromes epilépticos asociados al canal Nav1.1, de las cuales el SD es el más severo (Fig. 9), y en las que, en la mayoría, parece haber una relación fenotipo-genotipo ^{7, 132, 138}.

Encontramos:

- Mutaciones más leves que provocan disminución en la actividad del canal, por cambio de aminoácido (*missense*) o deleción/inserción en pauta de lectura, y,
- Mutaciones más agresivas que se traducen en pérdida total de función, por proteína truncada debido a deleción/inserción sin pauta de lectura o inserción de un condón de terminación prematuro.

De todas ellas:

- Aproximadamente el 52% son mutaciones de proteína truncada, 94% de las cuales son casos *de novo* clásicos de SD.
- El 27% son mutaciones con pérdida de sentido en el poro, de los cuales, un 75% son SD típicos.
- 12% son mutaciones con pérdida de sentido en el sensor de voltaje que se correlacionan con todo el espectro, desde FS hasta SD.

Esta gran variedad de mutaciones en SD, contrasta, por ejemplo, con GEFS+, espectro autosómico dominante, también asociado con convulsiones febriles y afebriles pero con pronóstico benigno y que solo se debe a la presencia de mutaciones por cambio de aminoácido¹³⁰.

Debido al importantísimo rol que tienen los canales de sodio en la excitabilidad neuronal, mutaciones en los genes que los codifican, resultan en un patrón anormal de producción de potenciales de acción que acaban causando síndromes epilépticos. La mayoría de las mutaciones que dan lugar a estos desórdenes se encuentran en el *SCN1A*, pero hay otros 5 genes implicados, 4 de los cuales codifican para subunidades alfa, *SCN2A*, *SCN3A*, *SCN8A*, *SCN9A* y el *SCN1B*, gen que codifica la subunidad auxiliar $\beta 1$ ^{77, 79, 139, 140}. Por ejemplo, mutaciones en un alelo del gen *SCN2A*, que provoca disminución en la intensidad de corriente del canal y de la expresión en membrana, también genera una familia de epilepsias benignas, autosómicas dominantes, en la que se incluye BFNIS (*Benign familial neonatal-infantile seizures*). Estas epilepsias responden bien a los anticonvulsivos y suelen remitir espontáneamente durante el primer año de vida. En cambio, ha sido identificada una mutación *missense* en GEFS+ y una de proteína truncada en un paciente que muestra las características típicas del SD¹⁴¹.

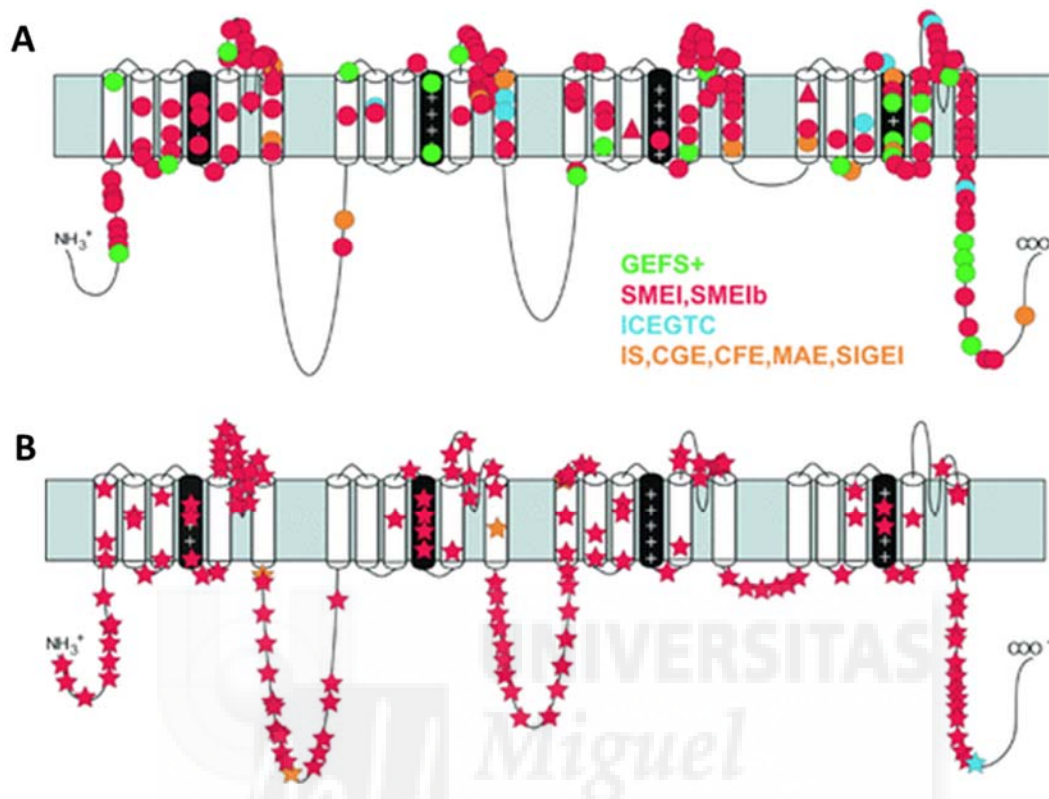


Figura 9. Mutaciones puntuales en *SCN1A* en pacientes con epilepsia genética asociada.

A) Mutaciones con cambio de sentido (círculos) y deleciones en pauta de lectura (triángulos). **B)** Mutaciones de proteína truncada (estrellas). En colores se indican los diferentes síndromes epilépticos asociados a cada mutación: **GEFS+**, *generalized epilepsy with febrile seizures plus*; **SMEI**, *severe myoclonic epilepsy of infancy*; **SMEIb**, *borderline SMEI*; **ICEGTC**, *idiopathic childhood epilepsy with generalized tonic-clonic seizures*; **IS**, *infantile spasms*; **CGE**, *cryptogenic generalized epilepsy*; **CFE**, *cryptogenic focal epilepsy*; **MAE**, *myoclonic astatic epilepsy*; **SIGEI**, *severe idiopathic generalized epilepsy of infancy*. (Imagen cortesía de M. Meisler y J. Kearney para W. Caterall, 2008 ¹⁴²).

Centrándonos en el Síndrome de Dravet, se conocen ya 800 mutaciones puntuales heterocigóticas que lo causan, la mitad de estas mutaciones resultan en proteína truncada, lo que para algunos autores demuestra haploinsuficiencia del *SCN1A* ^{139, 143}. Se han encontrado pacientes con SD que presentan deleciones en varios genes del clúster de canales de sodio del cromosoma 2 al que pertenece *SCN1A*. Deleciones de 3 a 9 Mb en *SCN1A*, *SCN7A*, *SCN9A*, *SCN2A* y *SCN3A*, de 0.6 a 6 Mb en *SCN1A*, *SCN7A*, *SCN9A* y de 0.2 to 0.6 Mb en *SCN1A*, *SCN9A*, siendo el fenotipo de estos pacientes igual o incluso menos severo que los que solo poseen

mutaciones con pérdida de función del *SCN1A*¹⁴⁴⁻¹⁴⁷. Estos hallazgos junto a estudios del fenotipo normal de ratones heterocigotos sin un alelo del *Scn2a*, *Scn3a* y *Scn9a*¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ ha llevado a pensar que únicamente *SCN1A* es haploinsuficiente. Esta dependencia, en neuronas inhibitorias GABAérgicas, de los niveles de este canal de sodio en concreto, parece que es debido a su localización subcelular y su función en el segmento inicial del axón⁷⁷.

Todos los tipos posibles de alteraciones en el ADN están presentes en pacientes con SD con el gen *SCN1A* afectado. Mutaciones con pérdida de sentido, sin sentido, reordenamientos de *splicing*, deleciones o inserciones, deleciones parciales de exones individuales y deleciones a gran escala de varios exones simultáneamente, incluso en gemelos monocigóticos y deleción del gen completo, con algún caso de hermanos sin el gen¹³¹.

Al contrario de lo reportado inicialmente por Claes et al. , que hablaban de mutaciones de proteína truncada como las más comunes¹⁰⁸, hay estudios que apuntan a una mayoría por mutación puntual con cambio de aminoácido¹⁵¹. En estas mutaciones sin sentido y mutaciones de *splicing* pero en pauta de lectura, se introduce un codón prematuro de terminación, lo que parece que provoca la degradación del ARNm sin sentido como mecanismo de supervivencia celular, con la excepción de aquellos que afectan al último exón codificante, el número 26, que darán una proteína incompleta¹⁵². Esto es compatible con el efecto producido por otro tipo de mutaciones, como la alteración del codón de inicio de la traducción o microdeleciones que incluyen regiones esenciales para la proteína. El efecto de todo este espectro de mutaciones apunta a la haploinsuficiencia con pérdida total de función del alelo mutado.

Parece que la haploinsuficiencia del Nav1.1, se ve compensada por un reemplazamiento de los canales que faltan por la isoforma Nav1.6. Estudios en sistemas heterólogos y cultivos primarios de neuronas indican que aumenta la probabilidad de iniciación del potencial de acción ya que la activación del Nav1.6 depende de voltajes más hiperpolarizantes que Nav1.1, lo que disminuye el potencial umbral de disparo¹⁵³⁻¹⁵⁵. Además, se ha visto que en ratones modelo Dravet doble *knock-out*, *Scn1a*^{+/-} y *Scn8a*^{+/-}, han disminuido las convulsiones

demostrando que la interacción entre estos dos canales es determinante para la excitabilidad neuronal ¹⁵⁶.

Existen páginas de internet específicas para la información sobre el gen *SCN1A*, que relacionan genotipo con fenotipo, aunque la última actualización fue en el año 2011 y hay bastantes novedades desde entonces.

Debido a que el descubrimiento de la etiología genética del Síndrome de Dravet es relativamente reciente, seguirá siendo motivo de estudio en los próximos años. Por ejemplo, aunque se creía que las mutaciones aparecían únicamente en un alelo, recientemente se ha realizado un estudio sobre 4 niños de dos familias diferentes, con epilepsia infantil, que presentan mutaciones homocigóticas heredadas en *SCN1A* y sugiere que la localización y naturaleza en el cambio de aminoácidos ha evitado el desarrollo de la enfermedad en los padres heterocigotos portadores, siendo el efecto en ambos alelos acumulativo causando la enfermedad ¹⁵⁷.

Otro de los puntos que causa controversia es si hay otros genes que causan Síndrome de Dravet en pacientes en los que no se han encontrado mutaciones en *SCN1A*. Algunos de los genes que se barajan son *CHD2*, *GABRA1*, *GABARG2*, *STXBP1*, *SCN1B*, *SCN2A* y *PCDH19* ¹⁵⁸⁻¹⁶¹, que, aunque los fenotipos comparten similitudes serían casos atípicos para SD. Algunos autores los aseguran como genes portadores de mutaciones responsables de la enfermedad y otros sugieren que la nueva generación de métodos de secuenciación, revelarán mutaciones de *SCN1A* en pacientes típicos SD, hasta ahora inadvertidas. Estos autores consideran que los demás genes afectados son genes modificadores, por ejemplo, *CACNA1A* o *SCN9A*, que pueden estar asociados con una complicación del fenotipo prolongando la duración de las crisis ^{162, 163}. Estudios comparativos de *SCN1A* con sus genes parálogos *SCN2A* y *SCN3A*, y con sus ortólogos en ratón, revelan que existen 11 secuencias no codificantes conservadas en la región UTR-5', al menos dos de los cuales podrían influir en la transcripción ⁷⁸. Años más tarde, se encontraron mutaciones "perdidas" en pacientes con Síndrome de Dravet, *SCN1A* negativos inicialmente, utilizando NGS (*Next-Generation Sequencing*) que puede analizar un set de genes, un exoma o incluso un genoma completo en un solo experimento y con

tecnología WES (*Whole-Exome Sequencing*)¹⁶⁴. Esto hace considerar la posibilidad de la existencia de mutaciones aún no encontradas en regiones codificantes o no del gen, o incluso variaciones epigenéticas que puedan causar un fenotipo típico del Síndrome de Dravet en pacientes aún sin diagnóstico genotípico.

3.3 Patofisiología y genotipo

De todos los mecanismos patofisiológicos que intentan explicar las manifestaciones clínicas del Síndrome de Dravet, la más ampliamente aceptada es **“LA HIPOTESIS DE LAS INTERNEURONAS”**, que se resume en que, mutaciones con pérdida de función en Nav1.1 provocan la inhibición de interneuronas GABAérgicas inhibitorias lo que resulta en una sobreexcitación. Con esta hipótesis es fácil predecir que todas las áreas del encéfalo en las que haya presencia de neuronas GABAérgicas se verán patológicamente afectadas en pacientes con Síndrome de Dravet y sus manifestaciones serán consecuencia de ello.

La primera confirmación *in vivo* de que la haploinsuficiencia de *Scn1a* conllevaba crisis epilépticas fue gracias al primer modelo de ratón Dravet, creado por el grupo de William Caterall y en el que la delección global del último exón del gen provocaba un fenotipo de crisis recurrentes tanto en los animales homocigotos como en los heterocigotos⁸⁰. La técnica del *patch-clamp* sobre neuronas disociadas extraídas del hipocampo de estos ratones reveló que las neuronas bipolares GABAérgicas, pero no las piramidales Glutamatérgicas, tenían una dramática reducción de corrientes de sodio. Desde entonces, se han generado otros modelos de ratón con SD, algunos portadores de mutaciones humanas concretas, por ejemplo, *SCN1A*^{R1407X/+}, del grupo de Yamakawa. Esta mutación en el exón 21 del gen, truncaba la proteína en el lazo S5-S6 del DIII y se comprobó mediante inmunohistoquímica y Northern blot, que las células implicadas eran interneuronas inhibitorias parvalbúmina positivas, responsables de la patogénesis de las crisis¹⁶⁵.

Los nuevos avances en biología celular y biología del desarrollo, han permitido el estudio de muchas enfermedades utilizando otros modelos como por ejemplo las células madre. Así,

iPSCs (*Induced Pluripotent Stem Cells*), derivadas de neuronas de pacientes Dravet, en su mayoría GABAérgicas y Nav1.1 positivas, revelaron mediante la técnica de *current-clamp* una deficiencia en la generación de potenciales de acción con amplitudes atenuadas ante una inyección de corriente que despolarice la membrana, sobre todo a intensidades más altas, consistente con la patofisiología presentada en el Síndrome de Dravet en la que se observan la incapacidad neuronal de responder adecuadamente a la estimulación de alta intensidad como puede ser la temperatura, la luz o las emociones ¹⁶⁶. Además otros estudios con iPSCs obtenidas de pacientes, sugieren que tanto las neuronas inhibitorias GABAérgicas como las excitatorias Glutamatérgicas de la parte frontal del cerebro poseen un incremento de densidad de corrientes de sodio con hiperexcitabilidad, lo que podría apuntar a que la haploinsuficiencia del *SCN1A* se viera compensada por un aumento en la expresión de otros canales de sodio ^{167, 168}.

¿Por qué siendo un síndrome congénito no se manifiesta desde el nacimiento?

En el desarrollo normal, Nav1.3, durante la gestación y los primeros meses de vida se expresa en toda la membrana de las neuronas y a partir de los 6 meses es sustituido por el Nav1.1. En ratas, la isoforma 1.3 desaparece completamente y en humanos es sustituida en el segmento inicial del axón de todas las neuronas y en dendritas y soma de algunos grupos de neuronas del córtex y del hipocampo, lo que podría ser la respuesta a por qué las convulsiones febriles debidas a *SCN1A* comienzan durante el primer año de vida ^{26, 169, 170}.

Estudios en animales han demostrado que las consecuencias deletéreas de las convulsiones están estrechamente relacionadas con el estado del desarrollo en el que se encuentra el cerebro en ese momento, ya que en neuronas inmaduras induce una transformación que parece que incrementa la susceptibilidad convulsiva ^{171, 172}.

¿Por qué fotosensibilidad y desórdenes del sueño?

Al menos el 75% de la corriente de sodio de las interneuronas es responsabilidad del Nav1.1. Estas neuronas están ampliamente distribuidas por el SNC, incluyendo corteza, hipocampo, ganglio basal, hipotálamo, cerebelo y espina dorsal, y son en su mayoría

inhibitorias tras el nacimiento, a excepción de una subpoblación de las fibras retino-supraquiasmáticas cuya función excitatoria-inhibitoria está regulada por la luz. En período luminoso, estas neuronas aumentan de forma transitoria la transcripción de un co-transportador, NKCC1, que acumula cloro siendo el responsable de la función excitatoria. Este grupo de neuronas asegura la sincronización del ritmo circadiano con el ambiente y los correctos ciclos de sueño, lo que apunta a que la disfunción del núcleo supraquiasmático en el Síndrome de Dravet, podría ser el responsable de los trastornos del sueño y el ritmo ralentizado del EEG a partir del segundo año de vida ^{173, 174}.

¿Por qué crisis febriles?

GABA es un importante neurotransmisor para la termorregulación en el área preóptica e hipotálamo anterior lo que contribuye a la desinhibición en producción de calor o inhibición de pérdida de calor en situaciones de temperatura fría. Estudios en modelos animales indican que la pérdida de función en *Scn1a* disminuye el umbral de temperatura ante estímulos epileptiformes, viéndose empeorado por el hecho de que la fiebre *per se*, reduce reversiblemente la expresión en membrana de receptores GABA debido a un decremento del tráfico o un aumento de la endocitosis ¹⁷⁵.

¿Por qué SUDEP?

No parece que haya relación directa entre la severidad de las mutaciones en *SCN1A* y los casos de SUDEP. Lo que si se ha podido demostrar es la presencia de Nav1.1 cardíaco y que modelos de ratón *Scn1a*^{+/-} tienen prolongación de la onda QT del ECG, bradicardia, fibrilación ventricular, etc. Aunque esto no se observaba en ratones con inhibición selectiva del Nav1.1 cardíaco, es cierto que Nav1.1 es el mayor componente de las corrientes de sodio tardías en los miocitos ventriculares por lo que, aunque SUDEP parece tener una causa más neurológica que cardíaca, el deterioro de los miocitos podría estar contribuyendo ¹⁷⁶.

¿Por qué desórdenes motores?

Ataxia y fallos de la coordinación motora contribuyen de forma crítica en el retraso del desarrollo, la calidad de vida, la carga de cuidados físicos, emocionales y sociales, así como las muertes prematuras en pacientes con Síndrome de Dravet.

Nav1.1 y Nav1.6 son las isoformas que se expresan principalmente en el segmento inicial del axón y en los Nodos de Ranvier lo que incluye al 80% de las neuronas del cerebelo¹⁷⁷. Esta área es fundamental para el control del movimiento, el equilibrio y el aprendizaje motor. Las neuronas inhibitorias GABAérgicas de Purkinje del cerebelo son la única salida para la coordinación motriz y del equilibrio, desde la corteza al resto del organismo y su degeneración y disfunción ha sido ampliamente asociada con ataxia¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Ratones *knock-out* para Nav1.1 mostraban irregularidades en la longitud del paso, defecto en los reflejos y temblor en extremidades, todo ello consecuente con disfunción en el cerebelo y que es comparable con los problemas motores en SD. Medidas de *patch-clamp* en neuronas de Purkinje extraídas de estos ratones, revelaron que se reducían casi un 70% la amplitud del pico y las corrientes persistentes y resurgentes sin cambios en la cinética o la activación o inactivación dependientes de voltaje. Medidas en *current-clamp* revelaron que decrecía el ratio de disparos de potenciales de acción sin que disminuyera el umbral de disparo. Estos resultados fueron suficientes para concluir que la afectación de células de Purkinje están relacionados con déficits motores y ataxia¹⁷⁹. Es interesante que la no expresión de Nav1.1 en ganglios dorsales y ventrales explican la no afectación de la propiocepción o nocicepción.

¿Por qué fallo cognitivo?

Además de esto, parece que el cerebelo es responsable de otras co-morbilidades presentes en el Síndrome de Dravet, como por ejemplo el fallo en el desarrollo cognitivo ya que este “pequeño cerebro” contribuye a la secuencia correcta de adquisición de cognición durante los períodos de luz y la correcta organización de ello durante el sueño. Los modelos de ratón *Scn1a^{+/-}* mostraban hiperactividad, estereotipias, déficits de interacción social y fallos severos en la memoria espacial y contextual^{120, 181}.

3.4 Diagnóstico

Según la ILAE hay 9 criterios que se cumplen en más del 85% de los casos de Síndrome de Dravet positivos en mutación en *SCN1A*, que son: resistencia múltiple a fármacos antiepilépticos, múltiples tipos de crisis epilépticas, manifestaciones anormales en el EEG, desarrollo normal antes de la aparición de convulsiones, intensificación de la aparición de las crisis por hipertermia, comienzo de las crisis antes del año de edad, ataxia, signos piramidales o mioclonía masiva y retraso psicomotor. Si se cumplen al menos tres de estas características descritas por la ILAE, es un indicio claro de necesidad de test genético ^{116, 182}.

El diagnóstico precoz clínico y genético es fundamental para establecer un tratamiento adecuado a esta epilepsia refractaria. En nuestro país, uno de los proyectos de la Fundación Síndrome de Dravet es el diagnóstico clínico gratuito para cualquier paciente que sea diagnosticado como posible caso SD por un neuropediatra. Este es llevado a cabo por el Instituto de Genética Médica y Molecular del Hospital de la Paz de Madrid, y en los últimos años ha sido fundamental para el genotipado de 200 nuevas mutaciones en *SCN1A* y en otros genes modificadores que causan Síndrome de Dravet (www.dravetfoundation.eu/pacientes-y-familiares/solicitud-del-test-genetico/).

3.5 Farmacología y Tratamientos

El descubrimiento de la etiología genética del Síndrome de Dravet y la afectación de neuronas inhibitorias dio a conocer la problemática de los tratamientos antiepilépticos hasta ese momento, en los que bloqueadores de sodio no subtipo selectivos, exacerbaban los síntomas de los pacientes con expresión o función reducida de *SCN1A* ¹⁸³.

El Síndrome de Dravet cumple los criterios para incluirse en la lista de “indicaciones huérfanas” tanto por la FDA (*Food and Drug Administration*), con menos de 200000 pacientes en Estados Unidos, como por la EMA (*European Medicines Agency*), con un ratio de 5/10000 en Europa. Es decir, los productos en desarrollo para SD podrán designarse como

medicamentos huérfanos con obteniendo beneficios como reducción de impuestos, facilidades para la financiación y exclusividad de mercado una vez aprobado el fármaco.

A pesar de esto, actualmente no hay ningún fármaco aprobado por la FDA para el Síndrome de Dravet y en Europa, únicamente uno, el Stiripentol. Este, designado como *orphan-drug* en el 2001, fue aprobado por la EMA en 2007 como medicamento adicional en tratamientos paliativos integrales por reducir las crisis un 50%¹⁸⁴. Estas terapias combinadas de 3 o más fármacos antiepilépticos, pretenden disminuir las crisis en frecuencia y duración, mejorar los desórdenes cognitivos y motores, controlar los problemas cardiovasculares, respiratorios y otras co-morbilidades, así como aumentar la calidad de vida y las relaciones sociales, aunque menos de un 10% de los pacientes quedan libres de crisis¹⁸⁵

Actualmente, respecto a los tratamientos, hay directrices bien definidas. Entre ellas, la necesidad de evitar inhibidores de canales de sodio que pueden agravar la situación, por ejemplo, carbamazepinas que aumentan la frecuencia de las crisis ¹¹⁶ y tener en cuenta los efectos secundarios muy graves producidos por las benzodiazepinas, ampliamente administradas hasta ahora, ya que parece que, administradas de forma crónica, podrían causar incluso encefalopatía aguda o hipotonía, debiéndose restringir su uso al *status* epiléptico ¹⁸⁶. Diversos proyectos, la mayoría cofinanciados por la Fundación Síndrome de Dravet Europea, están estudiando posibles fármacos que no produzcan farmacoresistencia en los primeros años de tratamiento. Por ejemplo, la fenfluramina, un agonista del receptor de serotonina que ha mostrado en un ensayo clínico ya en pacientes que reduce las crisis en un 75% ¹⁸⁷ o los canabinoides, el principio no psicoactivo de la planta del cannabis, también como reductor de la frecuencia de las crisis¹⁸⁸⁻¹⁹⁰.

Hay algunos estudios que han demostrado que algunas mutaciones con cambio de aminoácido, no de proteína truncada como era de esperar, reducen la expresión en membrana por afectar al tráfico del canal y que algunos fármacos, fenitoína y lamotrigina, que rescatan la proteína retenida en el retículo endoplásmico aumentando la expresión y por tanto la densidad de corriente registrada¹⁹¹.

La idea de que se pudiera reequilibrar la generación del potencial de acción y por tanto reducir la corriente de sodio de neuronas excitatorias mediante mutaciones en otros canales, llevó a estudiar qué sucedería con el Nav1.6, canal ampliamente conocido por llevar a disparos repetitivos de alta frecuencia. Se vio que ratones doble *knock-out Scn1a, Scn8a*, mostraban disminución en las crisis epilépticas respecto a los *Scn1a*^{+/-} 153, 156, 192. Esto hace pensar que un buen tratamiento podrían ser bloqueadores selectivos del Nav1.6, hasta ahora desconocidos, y que se han suplantado por combinaciones de fármacos que intentan simular el efecto mediante incremento de la concentración de GABA por inhibición en la recaptación en los nervios terminales y la glía (tiagabina) o el incremento en la respuesta postsináptica de los receptores GABA a su neurotransmisor (benzodiazepinas=clonazepam) 193.

Así, la disminución selectiva en la actividad de los canales Nav1.6 y la idea de un aumento específico de la función o la expresión de las copias no mutadas del Nav1.1, son los dos objetivos que mueven las actuales investigaciones, aunque hasta el momento, solo se conocen neurotoxinas que aumentan las corrientes de sodio.

Estas ideas llevaron a la Fundación Síndrome de Dravet a poner en marcha varios proyectos para la búsqueda de un mejor fármaco paliativo o incluso una “cura” que atacara la base genética de la enfermedad (www.dravetfoundation.eu/investigacion/proyectos/). Para ello siguió varias vertientes en las que se han incluido por ejemplo, un proyecto de cribado de librerías de compuestos en peces cebra Dravet, en colaboración con Theracule Pharma, del cual surgió un candidato que reducía notablemente las crisis en este modelo animal y que se ha validado *in vitro* utilizando la técnica de cribado de esta tesis doctoral pero que estadísticamente no muestra la actuación de este compuesto a través de los canales de sodio Nav1.1 y Nav1.6 (mostrado en el capítulo de resultados). Se impulsó la creación de un ratón Dravet accesible para toda la comunidad científica, ya que la privatización de los recursos de otros laboratorios hacía casi imposible los avances en el conocimiento. Así se creó un ratón con síndrome de Dravet, *Scn1a*^{A1783V/+} *knock-in* condicional, para que pueda ser transportado grandes distancias, cosa imposible para ratones *knock-out* o *knock-in* puros, que sufrían graves crisis letales debidas a que los animales estaban sometidos a estrés, cambios de temperatura y presión, tres de las causas de disparo de las crisis en pacientes con Síndrome de Dravet.

INTRODUCCIÓN

Esta tesis doctoral ha sido el resultado del proyecto de cribado farmacológico para el Síndrome de Dravet. Utilizando sistemas heterólogos *in vitro* y técnicas de medida funcional de los canales específicos afectados en SD, se planteó la idea del reposicionamiento de fármacos, ya que, aunque un candidato sea “descubierto” en un laboratorio, los ensayos clínicos dificultan y retrasan el acceso de estos a los pacientes. Estudios recientes sobre 78 medicamentos huérfanos aprobados en Europa mostraron que el 38% se derivó de la reutilización de fármacos aprobados para otras indicaciones ¹⁹⁴. La posibilidad de acceder a grandes librerías de compuestos formadas por fármacos genéricos libres de patente o moléculas bioactivas que han superado las fases de toxicidad, farmacocinética y farmacodinámica de ensayos clínicos, terminó de impulsar este proyecto.





OBJETIVOS

Objetivos

La enfermedad conocida como Síndrome de Dravet es una patología caracterizada como una epilepsia severa infantil de graves consecuencias para los pacientes. La causa de esta anomalía es, mayoritariamente, la pérdida de función del canal Nav1.1 y, en muchos de los casos, una sobreactivación, por compensación, del canal Nav1.6. Con el fin de poder avanzar en la obtención de un tratamiento farmacológico que pueda ser utilizado como terapia para los enfermos, en esta tesis doctoral hemos puesto a punto una técnica automatizada de cribado masivo de moléculas tanto activadoras de Nav1.1 como inhibidoras de Nav1.6. Así pues, los objetivos específicos de esta tesis fueron:

- La puesta a punto de una plataforma automática de electrofisiología para el cribado masivo de moléculas con potencial farmacológico
- La búsqueda de moléculas activadoras de Nav1.1
- La búsqueda de antagonistas de Nav1.6
- Sentar las bases metodológicas para la detección rápida y masiva de posibles candidatos terapéuticos que puedan ser analizados en profundidad por otros sistemas analíticos.



MATERIALES Y

MÉTODOS

1 LÍNEAS CELULARES Y ANIMALES

1.1 Líneas celulares

La línea celular heteróloga HEKNav1.1wt, generada para un estudio sobre activadores de canales de sodio ¹⁹⁵, fue donada por el Dr. Massimo Mantegazza (*Institute of Molecular and Cellular Pharmacology* (IPMC), Universidad Nice-Sophia Antipolis Valbonne, Francia). Según se describe en *Oliveira et al.* ¹⁹⁵, esta línea celular estable fue creada en células de riñón humano de origen embrionario, HEK293, por transfección con un plásmido pCIN5 que contenía el gen *hSCN1* de la subunidad alfa humana del canal de sodio dependiente de voltaje Nav1.1 y un gen de resistencia a Geneticina para utilizar este antibiótico como método de selección clonal. El medio de cultivo utilizado ha sido DMEM-Glutamax sin L-Piruvato (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco), 1% de una solución de penicilina 10 U/mL y estreptomycin 10 µg/mL (Gibco) y 1% Geneticina 50mg/mL (Gibco), necesitando para su mantenimiento y proliferación un incubador humidificado con atmósfera 5% CO₂ y a 37 °C.

La línea celular CHO Nav1.6wt fue donada por UCB Pharma (UCB Pharma S.A. Bruselas, Bélgica). No es posible remitir referencia bibliográfica, ya que fue entregada con una comunicación personal. Para la obtención de éste sistema heterólogo, se modificó de forma estable la línea celular CHO, de ovario de hámster chino, fue modificada de forma estable con el gen *hSCN8A*, la subunidad alfa humana del canal de sodio dependiente de voltaje Nav1.6, y un gen que confiere resistencia a Higromicina B, utilizándose para la selección de los clones que han insertado el constructo. El medio de cultivo utilizado ha sido F-12 Nut Mix (Ham) (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco), 1% de solución de penicilina 10 U/m y estreptomycin 10 µg/mL (Gibco) y 2% Higromicina B a 50 mg/mL (Invitrogen), necesitando para su mantenimiento y proliferación un incubador humidificado con atmósfera de 5% CO₂ y a 37 °C.

Debido a que ambas líneas recombinantes fueron donadas, se utilizaron las líneas celulares HEK293 y CHO como controles tanto para la caracterización biológica como

electrofisiológica. Estas líneas se emplean habitualmente como células huésped para estudiar la expresión heteróloga y funcionalidad de canales iónicos ya que la expresión endógena de estas proteínas es baja ^{196, 197}. Los medios de cultivo utilizados serán los mismos que para las líneas heterólogas, pero sin los antibióticos de selección.

Las células se cultivaron de acuerdo al experimento para el que fueran a usarse, por lo que se describirán en los apartados correspondientes.

1.2 Animales

Se utilizó el cerebelo de un ratón hembra C57BL/6J, utilizado para el estudio de búsqueda de nuevos moduladores de canales iónicos para el tratamiento del dolor crónico que se lleva a cabo en el mismo laboratorio. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética de Investigación Experimental (CEIE) de la Universidad Miguel Hernández de Elche, de acuerdo a las directrices de la Comunidad Económica Europea, el Instituto Nacional de Salud y el Comité para la Investigación y competencias Éticas de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor.

2 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Para caracterizar biológicamente las líneas celulares estables donadas se quiso estudiar si habían sido construidas utilizando únicamente la subunidad alfa de los canales Nav1.1 y Nav1.6, o si también expresaban las subunidades $\beta 1$ y/o $\beta 2$. El hecho de que solo se utilice para su cultivo un antibiótico de selección, hace sospechar que únicamente expresen la subunidad alfa, aunque podría ser que el plásmido utilizado para las subunidades β llevara el mismo antibiótico de selección. Para ello se extrajo el ARN total de las 2 líneas celulares heterólogas de trabajo, HEKNav1.1wt y CHONav1.6wt. Además, utilizamos como control positivo de expresión, el ARN extraído de cerebelo de ratón y la línea huésped HEK como control negativo.

2.1 Extracción y aislamiento de ARN

Para la extracción y el aislamiento del ARN se utilizó el kit E.Z.N.A. HP Total RNA Isolation (Omega Biotek, VWR), siguiendo las indicaciones del fabricante.

El cerebelo de ratón, una vez diseccionado, se mantuvo hasta su uso en una solución de PBS con 1% de P/S a 4 °C. Las líneas celulares se crecieron en frascos de T25 cm² hasta 100% de confluencia y el día del ensayo se levantaron con 1mL de Tripsina / 0.25% EDTA (Gibco) que fue inactivada con 5 mL del medio completo respectivo. Se utilizó el precipitado de células, conseguido por centrifugación a 300g durante 5 min, para la extracción de ARN.

El cerebelo y las 3 líneas celulares fueron tratados con tampón de lisis y β -mercaptoetanol y se disgregaron con ayuda de una jeringa y agujas de 21G, 25G y 27G, haciendo pasar la mezcla 5 veces con cada grosor. La suspensión viscosa se centrifugó, se descartó el precipitado y la capa de grasa. El sobrenadante se pasó por una columna en la que queda retenido el ARN y tras varios lavados se eluyó de la columna con agua libre de ARNasas. La pureza y concentración de ARN de cada muestra fueron valoradas obteniendo por espectrofotometría en un Nanodrop 3300 (Nanodrop).

2.2 Amplificación mediante PCR

La obtención del ADN copia y la amplificación de los transcritos se realizaron con el kit Verso-1-Step RT-PCR ReddyMix Kit (Thermo Scientific), que permite llevar a cabo simultáneamente y en un solo paso las dos reacciones, retrotranscripción y la amplificación del ADNc. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las secuencias de ARNm de *SCN1A*, *SCN8A*, *SCN1B*, *SCN1BA*, *SCN2B*, *Scn1a*, *Scn8a*, *Scn1b* y *Scn2b*, se diseñaron utilizando la herramienta de *primer-blast* que ofrece la web del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Para la detección y amplificación de *SCN1B* y su variante de *splicing*, β 1A, se utilizaron los cebadores que aparecen en el artículo de Moran et al.⁵⁸.

Tabla 4. Protocolo de PCR

	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Retrotranscripción	53	30	1
Inactivación de la enzima verso	95	2	1
Desnaturalización	97	0.5	40
Hibridación	62	1	
Extensión (1 min/ 1 kb)	72	1	
Extensión final	72	5	1
Mantenimiento	4	-----	-----

En las tablas 4 y 5 se muestran, el protocolo utilizado en el termociclador y las secuencias de los oligonucleótidos *forward* y *reverse*, las temperaturas de unión a sus secuencias complementarias, y la longitud de los transcritos esperados, respectivamente.

2.3 Detección mediante electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (Low Agarose, Conda), utilizando Gel Red (Sigma) como intercalador de bases nitrogenadas y Gene Ruler 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas) como marcador de tamaño y pesos moleculares.

Tabla 5. Secuencias de los cebadores, T_m y tamaño del transcrito

Especie	Gen	Identificación	Secuencia 5'-3'	T _m (°C)	Tamaño transcrito
humano	<i>hSCN1A</i>	F hNav1.1	CTCCCAAAGGCAACGAGCA	69.5	679
		R hNav1.1	CCAGCGTTGTGGGAGTTGAC	68	
humano	<i>hSCN8A</i>	F hNav1.6	GGGCGGAAGGACAGAATCAA	68.4	841
		R hNav1.6	AACAGGTTTCAGCACCACCAA	65.6	
humano	<i>hSCN1B</i>	F hNavβ1/β1A	GGGAGGCTGCTGGCCTTAGTGGTC	75.1	600
		R hNavβ1	CTATTCGGCCACCTGGACGCCCGT	79	
humano	<i>hSCN1BA</i>	F hNavβ1/β1A	GGGAGGCTGCTGGCCTTAGTGGTC	75.1	400
		R hNavβ1/β1A	GTCCACTACCTCAATGTGGATCTTC	65.7	
humano	<i>hSCN2B</i>	F hNavβ2	GCTACCTCGCCCTGCCTTC	68.3	640
		R hNavβ2	GGTTGCCTTCACCGTCCGT	69.6	
ratón	<i>mScn1a</i>	F mNav1.1	ACACTTCAGGGGCTATCGAG	63.2	737
		R mNav1.1	CAGGTCCACAACTCCGTCA	66.3	
ratón	<i>mScn8a</i>	F mNav1.6	AGGCCTGAAGACAATCGTGG	66.4	817
		R mNav1.6	TCTCCTCCCCTCAGAGAGC	65	
ratón	<i>mScn1b</i>	F mNavβ1	AAGATTGCTGCTGCTACGGA	64.9	457
		R mNavβ1	TGTGGGAAGTGGCCTATGTG	65.9	
ratón	<i>mScn2b</i>	F mNavβ2	TCCTTGGTCCCTCAATCACC	66.2	720
		R mNavβ2	CAGGCTCCGGTACTTGGT	65	

3 FLPR®; POTENCIAL DE MEMBRANA

Entre las técnicas utilizadas para realizar cribados de alto rendimiento en canales iónicos para el descubrimiento de nuevos fármacos, se encuentran las técnicas ópticas ¹⁹⁸, por ejemplo, estudios de fluorescencia ¹⁹⁹. Mientras se ponía a punto el método de *patch-clamp* automático, se decidió probar una técnica alternativa basado en medidas de fluorescencia para detectar cambios en el potencial de membrana debido a compuestos que modulan o bloquean canales iónicos dependientes de voltaje. El kit utilizado fue *FLPR® Membrane Potencial Assay Kit* (Molecular Devices). Este método utiliza una sonda fluorescente silenciada por un *quencher*. Ante una despolarización de la membrana celular, la sonda permea (sigue a los iones positivos) y se aleja del *quencher*, comenzando a emitir fluorescencia. Tras una hiperpolarización, la sonda vuelve a salir acercándose al *quencher* y disminuyendo la señal fluorescente.

Este método se ha utilizado para estudiar la función de, por ejemplo, TRPV1 y Kv ²⁰⁰, así como Nav ²⁰¹. Debido a la propia naturaleza de la técnica consideramos que este ensayo alternativo nos permitiría un pre-cribado para buscar bloqueadores, ya que los canales de sodio tienen una cinética de apertura muy rápida, y la activación puede ser difícil de detectar, siendo por tanto esta técnica válida para ensayos con el canal Nav1.6wt.

Basándonos en la bibliografía y en estudios de aplicación realizados por los propios distribuidores del kit, utilizamos como método de despolarización Veratridina, un potente activador de canales de sodio, que actúa tanto en la apertura de los canales como en el mantenimiento del estado abierto y descrito en la sección sobre los químicos y toxinas utilizados.

Se realizaron varias pruebas de puesta a punto, explicadas en el capítulo de resultados. De forma detallada, el procedimiento experimental fue el siguiente:

Se sembraron placas de 96 pocillos negras con fondo transparente, previamente tratadas con una solución de Poli-L-Lisina 0.01% (Sigma), a 60000 cel/pocillo en un volumen final de

100 µL. Se incubaron durante 24h a 37 °C y 5% CO₂, obteniendo una confluencia por pocillo del 90%.

Para la lectura de fluorescencia se utilizó un equipamiento que permite la excitación a 530 nm y la emisión a 590 nm (POLARstar BMG LABTECH, Offenberg, Alemania). El día del ensayo se prepararon los compuestos a testar, así como la Veratridina utilizada para despolarizar la membrana celular, utilizando el tampón de trabajo del kit FLPR® Vm. Se reconstituyó un vial de sonda por cada placa de 96 pocillos con 10 mL de tampón, y se incubó durante 5 min. Se añadieron 100 µL de sonda diluida por pocillo tras haber retirado el medio de cultivo y se incubó 30 min a 37°C y 5% de CO₂. Durante el tiempo de incubación, se preparó el lector de fluorescencia, llenando el inyector correspondiente con Veratridina 1mM en 1% DMSO (partimos de un stock a 100mM en 100% DMSO y diluímos en el tampón de medida del kit) para una concentración final de 100 µM y 0.1% DMSO (preparado a 10x por que se inyectarán 10 µL en un volumen de 100 µL por pocillo). El protocolo de medida consistió en 20 ciclos totales, comenzando con una línea basal únicamente con sonda, de 5 ciclos, parada para la adición de los compuestos, otra basal de 5 ciclos con los compuestos, inyección de 10 µL de veratridina. Los cambios en la intensidad de fluorescencia se registraron durante 10 ciclos más.

Se utilizaron como controles de inhibición, TTX (Tetrodotoxina) a 50nM y 100 nM y lidocaína a 100 µM, 500 µM y 1 mM, siendo sus vehículos tampón citrato 0.005 y 0.01% y etanol 0.01, 0.05 y 0.1%, respectivamente. Como control de activación de canales de sodio fue ATX-II (*Anemona sulcata* Toxina II) 100 nM, 500 nM y 2 µM, siendo sus vehículos agua 0.01, 0.05 y 0.2% respectivamente. Se registra también el efecto de DMSO 0.01% como vehículo de la veratridina 100 µM.

El porcentaje de actividad de los canales de sodio fue calculado con la ecuación:

$$\% \text{ Actividad Canal} = \frac{(F_{co}-F_{ci})-(F_{vo}-F_{vi})}{(F_o-F_i)-(F_{do}-F_{di})} * 100$$

Ecuación 1

MATERIALES Y MÉTODOS

Donde F_{co} y F_{ci} es la fluorescencia antes y después de la inyección de veratridina en presencia de los compuestos, F_{vo} y F_{vi} , en presencia de los vehículos, F_o y F_i en presencia únicamente de la sonda, F_{do} y F_{di} , en presencia de DMSO, que es el vehículo de la veratridina.

Los datos crudos fueron trabajados en Excel y Graph Pad Prism y se representaron en gráficos de columnas como $\text{media} \pm \text{SEM}$ y se analizaron estadísticamente mediante análisis simple de las varianzas (ANOVA one-way), seguida de un test de comparación múltiple de Dunnet, de cada columna con la columna control de la señal con solución externa, siendo $P < 0.05$ indicativo de diferencia significativa. Se obtuvo un $n_{\text{total}}=3$ en un único ensayo.



4 ELECTROFISIOLOGÍA: IONFLUX™ -16

La descripción y protocolos generales para la utilización del sistema Ionflux™ se encuentran ampliamente detallados en la página web de *Fluxion-Molecular Devices*, por lo que aquí se hará una breve descripción de cada punto.

Puesto que una gran parte de esta tesis doctoral fue la puesta a punto de un sistema nuevo de medida, en el capítulo de resultados se explica con detalle todos los pasos y opciones estudiadas del proceso experimental indicando únicamente en el presente apartado los protocolos utilizados para la realización de nuestros experimentos.

4.1 IONFLUX™: PLATAFORMA AUTOMÁTICA DE PATCH-CLAMP

El sistema Ionflux™ está basado en la técnica electrofisiológica de *patch-clamp* que permite registrar corrientes iónicas a través de zonas muy pequeñas de membranas celulares o *patches*.

La técnica de *patch-clamp* o “fijación de voltaje en parches de membrana” fue desarrollada por Neher y Sakmann en los años 70²⁰²⁻²⁰⁴, por la que le fue concedido el Premio Nobel en Fisiología y Medicina en 1991. Esta es una adaptación de la técnica inicial de “fijación de voltaje” o *voltage-clamp* que permitió a Hodgkin y Huxley realizar un modelo de estudio sobre la generación del potencial de acción²⁰⁵⁻²⁰⁸, reconocido éste con el nobel de Fisiología y Medicina en 1963. A su vez, esto fue posible gracias a las primeras observaciones experimentales en electrofisiología, que llevaron a Cole y Curtis en 1938 a proponer a las membranas de células excitables como circuitos eléctricos equivalentes que se rigen por la Ley de Ohm²⁰⁹.

Esta técnica consiste esencialmente en presionar la punta de una micropipeta de vidrio contra la membrana celular y tras la aplicación de presión negativa a través de la pipeta, conseguir un cierre hermético o sello de alta resistencia, del orden de gigaohmios, conocido como *gigaseal*. En este momento la célula se encuentra en configuración de *cell-attached* o célula adherida. A diferencia del *voltage-clamp*, que utiliza dos electrodos, el *patch-clamp* utiliza un solo electrodo y se encuentra en el interior de la pipeta, inyectando a la célula la corriente necesaria para mantener un potencial de membrana constante. Los cambios desde el potencial de reposo de la membrana a los voltajes fijados y su retorno al potencial inicial se registran como corrientes iónicas, a través de un amplificador conectado a la micropipeta. A partir de la configuración de *cell-attached*, una ligera succión a través de la pipeta rompe el parche de membrana y se establece un contacto directo entre el interior de la pipeta y el medio intracelular, momento en el que decimos que la célula ha entrado en configuración de *whole-cell* o célula entera (Fig. 10).

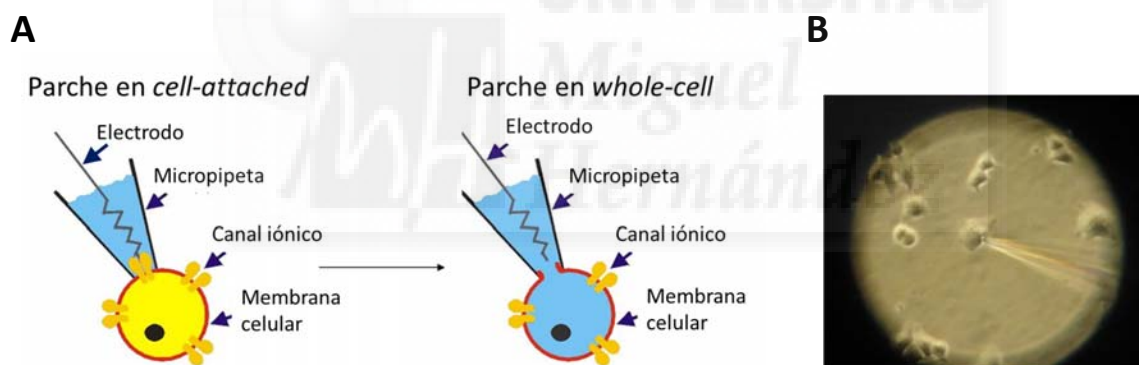


Figura 10. Técnica del *patch-clamp*. A) Célula en *cell-attached* y su paso a *whole-cell* B) Imagen real bajo microscopio de una micropipeta tocando la membrana de una célula

Esta plataforma permite realizar cribados masivos de compuestos. El equipo consiste en un “lector” de placas conectado a un ordenador con un software desde el que se controla.

Los pocillos de las placas poseen en el fondo un circuito de canales que los interconecta. Estos pocillos se utilizan para almacenar todo lo necesario durante el experimento, es decir,

suspensión de células, solución intracelular y compuestos a testar. El sistema trabaja con 20 células por cada canal amplificador para mejorar la consistencia de los datos y el ratio de éxito.

Una vez en el lector, las placas son selladas introduciéndose los electrodos en los pocillos correspondientes. El instrumento utiliza presión neumática que controla el flujo de fluidos, y la entrada en *whole-cell*.

El software controla: llenado de canales, sello a las células, rotura de la membrana celular, y el protocolo de voltaje/presión/fluidos durante la adquisición de datos. Este programa también permite la compensación de parámetros como la capacitancia de la membrana, resistencia en serie y las corrientes de fuga. Por último, el software permite el análisis de datos, así como exportar los resultados vinculados a Excel.

4.1.1 Plataforma Ionflux[™]-16

El sistema que contiene una interfaz eléctrica y neumática y 16 amplificadores de *patch-clamp*, necesita una fuente de presión y vacío, en nuestro caso aportado por una botella de Nitrógeno y una bomba de vacío.

4.1.2 Placas

Las placas de trabajo para el Ionflux[™]-16 están basadas en placas estándar de 96 pocillos. La parte inferior de la placa ha sido sustituida por una red de microcanales que interconectan los pocillos siguiendo un diseño establecido (Fig. 11A).

Cada placa está dividida en 2 zonas experimentales individuales de trabajo, que constan de 4 patrones de medida cada una, con 12 pocillos por patrón (Fig. 11A).

Cada patrón incluye 8 pocillos para compuestos, un pocillo para la suspensión de células (INlet), un pocillo para descartar los fluidos sobrantes (OUTlet), y dos pocillos donde se insertarán los electrodos de medida, denominados Trampas. Es aquí donde se encuentran las micropipetas que permitirán atrapar las células y romper la membrana para entrar en *whole-cell*, aportando dos puntos de registro de *patch clamp* independientes (Fig. 11A).

Existen dos variedades de placas; las placas “*Ensemble*” o de conjunto, en las que hay 20 micropipetas por trampa (Fig. 11B) que registran un sumatorio de corriente de todas las células atrapadas, aumentando el ratio de éxito, y la resistencia media generada por las 20 pipetas (habitualmente no llega al $G\Omega$), y las placas “*Single*” o de una sola célula, en las que solo hay una pipeta por trampa, registrando la corriente y la resistencia debida a un único sello (habitualmente *Gigaseals*).

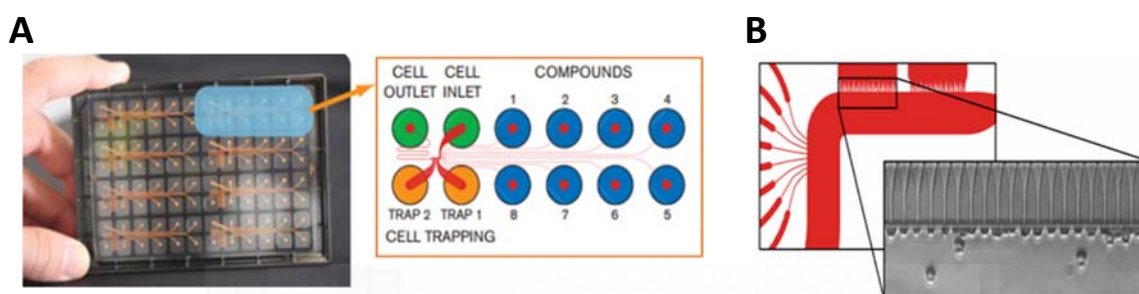


Figura 11. Placas de medida del equipo lonflux-16™. A) Esquema de un patrón de medida de una placa “ensamble” B) Representación del canal principal en el que desembocan los microcanales de los compuestos y las trampas e imagen bajo microscopio de una de las trampas y las 20 micropipetas con las células atrapadas.

Las placas se comercializan esterilizadas, tratadas, bañadas en una solución de peróxido de hidrógeno y selladas al vacío de forma individual para evitar crecimiento de contaminación en la red de microcanales. Cada placa está marcada con un código de barras único, que será reconocido por un lector laser manual antes del experimento. Tanto la dispensación como el almacenaje requieren refrigeración entre 4-7°C y tienen una caducidad de 3 meses desde su producción.

4.1.3 Software

Se han utilizado las versiones lonflux v.3.0, 3.5, 4.0 y 4.5. En las dos últimas, la herramienta de diseño y ejecución del experimento y la de obtención y análisis de datos, son dos programas independientes.

Como se observa en la figura 12, el software de diseño y ejecución del experimento, ofrece varias pestañas de control. *Setup*, para el diseño de la placa y la secuencia del

experimento; *Runtime*, que permite ver el experimento a tiempo real, *Runtime Data*, que permite ver *offline* que sucedió en el experimento.

Las imágenes que muestran las ventanas de trabajo del software, se adjuntan como capturas de pantalla en el Anexo I.

Organización del experimento o *Setup*

A) DISEÑO DE PLACA

En esta sección se selecciona la zona de trabajo de la placa (Zona 1 y/o Zona 2). Se pueden aportar datos sobre el tipo y concentración de las células utilizadas, las soluciones y cualquier información sobre el experimento que consideremos aclaratoria. Además, ofrece una plantilla tabulada en la que indicar qué compuesto o compuestos, y sus concentraciones, contiene cada pocillo (hasta 3 compuestos por pocillo, siendo útil, por ejemplo, para que consten los compuestos y sus vehículos). Se puede escribir y editar directamente sobre la plantilla o importar/exportar un archivo con formato Excel (Fig. AI-1 del Anexo I).

B) DISEÑO DEL PROTOCOLO EXPERIMENTAL

La secuencia del experimento contiene 4 subsecciones: ***Prime, Trap, Break y Data acquisition***. Todas ellas se explicarán más adelante cuando se describa el procedimiento experimental utilizado para los experimentos realizados. Cada subsección está dividida en 2 ventanas con diferentes comandos de edición con los que diseñar los protocolos (Fig. AI-2). Se describirán a continuación los diferentes parámetros a editar:

B.1.) Editor de presión

Determina la presión neumática que se ejerce en los pocillos de la placa, la cual es transferida al líquido de los microcanales que salen del pocillo. Esta presión determina la magnitud y dirección del flujo, es decir, presiones positivas (*Inlet* y C1-C8) que proveen de un flujo continuo hacia el pocillo de descarte (*Outlet*) y presiones negativas o de vacío (únicamente en las trampas) que permiten que las células queden atrapadas en las micropipetas y romper la membrana para entrar en *whole-cell*.

Con una gráfica y comandos para establecer el subprotocolo deseado, se seleccionan, para todos los canales o pocillos oportunos, los ítems de secuencia (continuo, pulso, rampa, series) y los tiempos de dichas secuencias (Fig. AI-3). Las unidades de presión utilizadas son:

- Presiones positivas, psi (*pounds-force per square inch*): o libra-fuerza por pulgada cuadrada (1 psi= 6894.5 Pa).
- Presiones negativas o de vacío, inHg: o pulgada de mercurio, (1 inHg $_{0^{\circ}\text{C}}$ = 3386.389 Pa).

B.2) Adición de compuestos

En esta ventana, exclusiva de la fase de *Data acquisition*, se diseña el protocolo de adición de los compuestos (Fig. AI-4).

Una gráfica y una tabla nos permiten editar el orden, en qué momento y durante cuánto tiempo ese compuesto estará bañando las células. Nos da la opción de importar/exportar una hoja de cálculo en formato Excel, lo que facilita los cálculos de tiempo. El tiempo total de adición de compuestos, debe coincidir con el establecido en el protocolo de presión.

Además, es aquí donde fijaremos la presión positiva ejercida sobre los pocillos de los compuestos, es decir, qué presión de flujo soportarán las células. Este punto debe ser coherente con la presión de flujo del canal principal para evitar que el compuesto se diluya antes de su llegada a la zona de medida.

B.3) Editor de Voltaje

Determina las secuencias de voltaje aplicadas a la célula, así como el potencial de membrana por parte del amplificador. Existe otro modelo de software para realizar experimentos de “fijación de corriente” con editor de corriente.

En este caso solo se diseña un protocolo de medida utilizando los ítems de secuencia (continuo, pulso, rampa, series y pulsos crecientes) y los tiempos de dichas secuencias, ya que los electrodos únicamente se insertan en las trampas (Fig. AI-5).

- **Editor de cursores**

Cursores “R”: Son los cursores que registrarán la resistencia de la membrana de la célula y del sello generado. Situando dichos cursores en un pequeño pulso de voltaje, permite ajustar la línea base durante todo el experimento.

Cursores “ΔI”: Un cursor medirá la corriente de interés y el otro la corriente en la línea basal. El sistema, automáticamente sustraerá ambos valores y se representarán a tiempo real durante el experimento en una gráfica Intensidad de corriente vs. tiempo.

Para el método de medida, el sistema toma por defecto un solo punto, pero se pueden seleccionar varios puntos, permitiendo indicar si se toma el punto mínimo, máximo o la media de ellos. Los cursores y el método de cálculo se pueden modificar durante el experimento y en la obtención de datos una vez finalizado el ensayo.

- **Ratio de registros**

Permite seleccionar el número de registros que el amplificador graba durante el experimento. Se indica en registros por segundo, y el número dependerá del tipo de cinética del canal que estemos estudiando.

B.4) Otros ajustes de Voltaje

Este cuadro de diálogo presenta varias opciones. Comunes para todas las subsecciones son el voltaje fijado al que se somete a la membrana y el tiempo completo del protocolo de voltaje. Únicamente para *Data acquisition*, encontramos el ajuste de la línea basal, y la compensación automática/manual de las corrientes de fuga (Fig. AI-5).

B.5) Controles del amplificador

Estos ajustes son similares a los que se realizan en la técnica de *patch-clamp* manual. Permiten compensar parámetros electrofisiológicos que afectan a la medida de corriente y a los registros. Algunos de ellos son aplicados automáticamente, y otros, que aparecerán en la ventana control, presentan la opción de automático o manual (Fig. AI-6).

- **Componente rápida de la capacitancia, C_{fast}**

Elimina la corriente capacitiva debida a la conexión del amplificador al electrodo. Se suele llamar capacitancia de la pipeta. Este valor se corrige automáticamente antes de comenzar el experimento.

- **Junction Potencial, J_p**

Es un potencial de difusión generado por la transferencia iónica una vez que las soluciones interna y externa entran en contacto. Se corrige de forma automática tras la fase de *Prime*.

- **Resistencia de corrientes de fuga, R_{leak}**

La compensación de las corrientes de fuga, debidas a la ligera despolarización de la membrana celular por encima del umbral, es posible hacerla *offline* una vez terminado el experimento, siendo esto recomendable para poder disponer también de los datos crudos.

- **Componente lenta de la capacitancia, C_{slow}**

Es la capacitancia de la membrana de la célula, C_m . Estas corrientes capacitivas, o transientes, solo se observan cuando la célula ha entrado en *whole-cell*, y se compensarán de forma automática o manual una vez que se han estabilizado los sellos y las corrientes que se desean registrar.

- **P/n, compensación de artefactos**

Es muy probable que una pequeña parte de la transiente capacitiva permanezca, aunque se compense la C_m . Esto es debido a que el amplificador utiliza una constante de vida media $\tau = 200\mu s$ y una amplitud que puede ser ajustada. Esta parte no compensada puede ser eliminada automáticamente usando una rutina de tipo P/n, es decir, se aplican una serie de pulsos de voltaje conocido, el amplificador registra los artefactos y estos son extrapolados y restados de cada *sweep* medido durante todo el experimento. Se puede dejar indicado que se compense de forma automática o hacerlo manualmente durante el experimento, aplicándose en el siguiente registro de corriente tras modificarlo.

- **Resistencia en serie, R_{series}**

La resistencia en serie es la suma de todas las resistencias entre el amplificador y la membrana de la célula. Del mismo modo que C_{slow} , es posible corregirla de forma automática o manual una vez que los sellos y corrientes son estables y siempre tras haber compensado C_{slow}

- **Ganancia del amplificador**

La ganancia o sensibilidad del amplificador es una relación entre la magnitud a medir y la señal que capta el equipo. Se ajusta manualmente y se recomienda una ganancia baja durante todo el experimento, excepto si se obtienen sellos de más de 5 MOhm.

Ejecución del experimento

Para la ejecución del experimento se debe cargar un archivo con extensión .IET (*Ionflux Experiment Template*) que habremos diseñado con anterioridad.

Una vez comenzado el experimento, se irán sucediendo las 4 subsecciones que serán explicadas detalladamente más adelante, cuando se indique el procedimiento experimental seguido para esta tesis doctoral. Brevemente y de forma general, el experimento comienza por el *Prime*, en la que se llenarán todos los microcanales con sus respectivos líquidos, después, durante el *Trap*, empezará a fluir la suspensión de células desde el pocillo "IN" hasta el "OUT" pasando por las trampas y quedarán atrapadas en las micropipetas por succión de estas, en *Break* se logrará romper el parche de la membrana llegando a célula completa y entrará en última subsección de *Data acquisition*, donde los compuestos irán bañando las células en el orden y durante el tiempo indicado, aplicándose los pulsos de voltaje diseñados y registrando los cambios en la intensidad de corriente entre el exterior y el interior de la célula.

Todos los pasos se pueden seguir mediante una gráfica a tiempo real Resistencia vs. Tiempo o Incremento de Corriente vs. Tiempo, teniendo además la opción en la sección de adquisición de datos de desplegar una gráfica de Intensidad de corriente en la que veremos la intensidad en cada uno de los pulsos de voltaje a tiempo real, y que son los barridos que

podremos estudiar una vez haya finalizado el experimento, *offline*. Esta gráfica a tiempo real consume muchos recursos del ordenador y se ha comprobado, como aconsejan los fabricantes, que los experimentos dan mejor resultado si no se activa. En este momento, una vez que los sellos son estables, y vemos que los registros de la corriente o resistencia son coherentes, podemos modificar algunos ajustes del amplificador, C_{slow} , P/n y R_{series} , como ya se indicó en el apartado correspondiente.

Obtención de datos crudos o *DATA ANALYZER*

Existe, a disposición del usuario, un manual, que encontramos en versión para imprimir o en versión interactiva, por lo que se explicará de forma general y resumida las opciones de esta herramienta.

Una vez cargado el archivo seleccionado, aparecerá una gráfica Incremento de Intensidad vs. Tiempo del experimento, con los datos de las dos trampas de cada uno de los patrones que hayan entrado en experimento, con un código de colores, pudiendo destacar el curso de una o varias trampas. Existe una ventana de análisis de eventos, desde la cual ordenamos que se destaque el comienzo y final de la adición de cada compuesto (Fig. AI-7).

La gráfica ΔI vs. Tiempo, está vinculada a los barridos realizados durante todo el experimento, con los pulsos de voltaje diseñados. Estos barridos se pueden ver abriendo la ventana de "*real time sweeps*", apareciendo una gráfica con los datos de cada trampa, en un *sweep* determinado. (El que esté marcando el cursor de selección de la gráfica ΔI). Así mismo, lo que se verá reflejado en la gráfica ΔI , será el incremento entre los valores de la intensidad de los dos cursores que aparecen en la gráfica del *sweep* (Fig. AI-8A), que podemos mover según lo que deseemos ver.

Este es el momento de realizar la sustracción de las corrientes de fuga mediante la opción de "*offline leak subtraction*", ajustándose las gráficas a la línea basal de corriente.

Para seguir determinados eventos simultáneamente existe la posibilidad de superponer esos barridos en una sola gráfica de “*sweep overlay*”. Admite hasta 14 *sweeps* de una o varias trampas (Fig. AI-8B).

Todas las gráficas tienen un desplegable con el que podemos modificar los colores, el grosor de las líneas, la escala de los ejes, copiar las gráficas o guardarlas como imagen, etc.

La ventana de análisis de eventos, permite seleccionar aquellos que consideramos de interés, siendo, por ejemplo, un único punto, o la media de varios puntos elegidos, y cuantos segundos después de la adición de cada compuesto (Fig. AI-7). La tabla de análisis que obtenemos dará información relevante como es el número del evento (C1-C8) y el patrón al que pertenece (P1-P8), el nombre del compuesto y la concentración (si ha sido indicado en el *setup* de la placa), la intensidad de corriente, la resistencia y la trampa (T1 o T2) a la que se refiere. Se da la posibilidad de crear una plantilla de análisis en Excel, que recuerde los eventos de interés para futuros experimentos (Fig. AI-7).

Una vez que tenemos los eventos en las gráficas, se procede a exportar los datos desde una ventana multiopción que permite diferentes formatos: Excel, PCclamp Clampfit y CSV. Es posible exportar los datos de los barridos deseados o de los cursores de interés. En el caso de las tablas de análisis de eventos, solo se ofrece la posibilidad de exportar en Excel.

4.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.2.1 Células y Soluciones

Células

El cultivo de las células y su manejo pre-experimento es uno de los puntos clave de esta tesis. Tras una larga puesta a punto, detallada en la sección de resultados, concluimos que las células debían crecerse en frascos de cultivo de 175 cm², durante un mínimo de 48 horas, a 37°C y una atmósfera de CO₂ del 5%, hasta un máximo de confluencia de 90% para las líneas celulares CHO y CHONav1.6wt y un 60% de confluencia para las HEK y HEKNav1.1wt. El día del experimento, las células se lavaban con PBS 1X sin Ca²⁺ y sin Mg⁺ (PAA Laboratories GmbH), por duplicado, para retirar todo el medio y las sustancias de desecho, y se incuban durante 30 minutos a 37°C y 5% de CO₂ con 10 mL de Detachin™ (Genlantis). Detachin™ es una solución enzimática utilizada igual que la tripsina, pero que contiene la proteasa que rompe la adherencia de las células con la superficie y entre ellas y su inhibidor. Tras el tiempo de incubación, observamos las células al microscopio para comprobar que la presencia de agregados es mínima y se recoge la suspensión celular. Esta se centrifuga a 800 G durante 1 minuto, y el precipitado de células se resuspende con 10 mL de medio CHO-S_SFM II con L-glutamina (*Serum free médium for suspension CHO*) (Gibco), 25 mM de HEPES ácido, 1% P/S. Esta suspensión se lleva a un frasco T25 cm² y se mantiene durante 2 horas en agitación orbital a 150 rpm, a temperatura ambiente. Durante las dos horas de agitación, se realiza un protocolo de cloración e hidratación de los electrodos del equipo, se preparan los compuestos a testar, se lava la placa del peróxido de hidrógeno que contiene, con agua bidestilada a presión manual 3 veces, y mediante un protocolo de lavado que introduce agua en todos los microcanales. En este momento se hace un recuento del número de células que tenemos en agitación para predecir la dilución que necesitaremos después. Una vez que la placa está limpia, se añade a cada pocillo el compuesto o las soluciones correspondientes, para efectuar un protocolo de *Preprime* de 5 minutos, en el que se llenan todos los microcanales con los líquidos oportunos. En el pocillo "IN" donde irán las células se añade solución externa Durante ese tiempo, retiramos las células de la agitación y tras comprobar bajo el microscopio que no

hay presencia de agregados, se recogen y se centrifugan 1 min a 800G para eliminar el medio. Se hacen dos lavados con 3 mL de solución externa y centrifugación 1 min a 800G, y se resuspende en solución externa hasta $2,5-3,5 \cdot 10^6$ cel/mL para la línea HEK y su heteróloga y hasta $4-6 \cdot 10^6$ cel/mL para CHO y su heteróloga. Es decir, $6-8 \cdot 10^5$ y $1-1,5 \cdot 10^6$ células, en 250 μ L, por pocillo, respectivamente. Los lavados se efectúan con máximo cuidado, sin hacer burbujas y sin excesivos pases de las células por las puntas de pipeta para no dañar las membranas. Una vez terminado el *Preprime*, se extrae la placa del lector, se retira la solución externa de los pocillos "IN" y se añaden 250 μ L con las concentraciones anteriormente indicadas. Las células deben estar el menor tiempo posible en solución externa entre la retirada de agitación y el comienzo del experimento por lo que es recomendable haber cargado ya el archivo del protocolo necesario (explicado detalladamente más adelante), según la línea celular y el tipo de registro deseado, importado desde Excel el archivo de trabajo de la plantilla de la placa y el orden y el tiempo de adición de compuestos. Una vez cargadas las células, se inserta la placa en el lector, y se procede al inicio del ensayo.

Soluciones

Para estudiar la función de canales iónicos mediante técnicas electrofisiológicas, se utilizan soluciones que simulen las condiciones fisiológicas de las células, teniéndose en cuenta la composición química, la osmolaridad y el pH. Las soluciones recibirán el nombre de "Solución externa o extracelular" (aparecerá referida como buffer en el texto y/ las gráficas) ya que será aquella que baña las células y "Solución interna o intracelular", la que vaya a estar en contacto con el citoplasma celular. Una vez sabido esto, el otro punto a tener en cuenta es que tipo de corriente iónica queremos medir. Cuando se trabaja con sistemas de canales recombinantes, a menudo se pretende medir únicamente la corriente debida a un ion concreto, de este modo, se sustituyen los iones fisiológicos por otros isovalentes de peso atómico aproximado.

Tras probar diferentes soluciones externas e interna, finalmente se optó por aquellas que ofrecían mejores resultados y eran válidas, tanto para HEKNav1.1wt como para CHONav1.6wt. En las soluciones testadas el ion mayoritario de la solución externa es Na⁺, nuestro catión de

interés y el Cs⁺ en la solución interna, que sustituye al K⁺ por si se expresara algún canal de potasio de forma endógena.

En la tabla 6 se muestra la composición de ambas soluciones:

Tabla 6. Soluciones de trabajo

Solución externa 320 mOsm pH 7.4	Solución interna 315 mOsm pH 7.2
NaCl	5 mM
KCl	100 mM
MgCl ₂ anhidro	45 mM
CaCl ₂ · 2H ₂ O	10 mM
HEPES ácido	5 mM
D-glucosa	

Las dos soluciones se preparan siguiendo los mismos pasos y siempre con agua bidestilada (Milipore) para evitar el aporte de iones no deseados, que se utiliza también para aclarar todo el material a utilizar. Tras añadir todos los componentes en un vaso de precipitados con agua, la disolución siempre resulta ácida debido al HEPES ácido (ácido 4-(2-hidroxietil)-piperazine-1-etanosulfónico), por lo que debe ajustarse el pH con el hidróxido del ion mayoritario, siendo en nuestro caso NaOH hasta pH 7.4 para la solución externa y CsOH hasta pH 7.2 para la solución interna. Se mide la osmolaridad de la disolución final con un Osmómetro (Osmomat 030, Gonotec).

4.2.2 Protocolos de registro y análisis de resultados

Cómo ya se ha dicho en la descripción del software, se deben diseñar las 4 fases de las que consta el experimento, ajustando la presión y/o vacío, y los voltajes. En las fases de *Prime*, *Trap* y *Break*, los valores dependerán de la línea celular, pero se mantendrán constantes

independientemente del protocolo de adquisición de datos. Indicaremos a continuación los subprotocolos utilizados para esta tesis doctoral.

Prime

El objetivo de esta fase es completar el llenado de los microcanales con sus respectivos fluidos, por lo que se aplicarán presiones positivas y un pulso de voltaje únicamente para comprobar si los electrodos están conectados. Las células aún no entran en juego por lo que esta fase es común sea cual sea la línea celular a estudio.

La duración total del *Prime* será de 55 s. Ajustaremos a una presión de 5 psi en los pocillos de compuestos y las trampas durante 20 s, 30 s más a 2 psi, alargando los 2 psi durante 5 s más únicamente en las trampas y de 1 psi en el canal principal durante 30 s y de 0.4 psi otros 15 s. El pulso de voltaje tendrá una línea base a 0 mV durante 50 ms, seguido de 50 ms a 20 mV, y otra de nuevo basal otros 50 ms (Fig. AI-9).

Trap

En esta segunda fase, la suspensión de células depositada en el pocillo "IN" de la placa, es empujada mediante presión positiva a lo largo del canal principal hacia los pocillos de las trampas, donde se encuentran las 40 micropipetas ejerciendo una presión inversa. Al paso del flujo de células por las trampas, éstas quedan atrapadas formando los sellos deseados.

Esta fase ya se ve condicionada por la morfología de la línea celular utilizada. Así, para las líneas HEK y HEKNav1.1wt, células de mayor tamaño y que tienden a formar agregados, la duración total del *Trap* es de 135 s. Las trampas ejercen un vacío constante de 7 inHg durante los 135 s. En el canal principal se aplican 25 pulsos de 0.2 psi 0.5 s y antes y después de los pulsos una línea base de 0.1 psi durante 5 s. Con estos pulsos repetidos se consigue que las células se detengan al pasar por las micropipetas favoreciendo el sello (Fig. AI-10). Para las líneas CHO y CHONav1.6wt, células de menor tamaño, morfología más redondeada y que no se agregan, es suficiente con 105 s de *Trap*, de los cuales, 30 s se ejerce un vacío de 6 inHg, y

los otros 75 s se baja a 5 inHg. El número de pulsos del canal principal se reduce de 25 a 19, siendo los valores de presión igual que para las células más voluminosas (Fig. AI-11). El pulso de voltaje para ambas líneas conlleva un potencial de membrana basal fijado en -80 mV, donde nos aseguramos que los canales estudiados no están activados y un pequeño salto a -90 mV para monitorizar los cambios de la resistencia del sello (Figs. AI-10 y AI-11).

Break

Una vez que se han hecho los sellos, se entra en *whole-cell* rompiendo el parche de la membrana y accediendo al interior celular. Esto se consigue ejerciendo una succión ligeramente mayor a la de la fase anterior.

La presión inversa ejercida en esta fase también depende de la línea celular a estudio. Así, para las HEK y HEKNav1.1wt, el subprotocolo dura 30 s en el que se aplican dos pulsos de succión con los siguientes valores, 5 s de 7 inHg, 5 s de 10 inHg, baja durante 5 s a 6 inHg, se incrementa hasta 14 inHg durante 10 s y se mantiene a 5 inHg durante 5 s más (Fig. AI-12). Para CHO y CHONav1.6wt esta fase también dura 30 s, pero con un único pulso de 5 s a 5 inHg, 10 s succión a 10 inHg y de nuevo a basal de 5 inHg durante 15 s (Fig. AI-13). El pulso de voltaje diseñado igual para ambas líneas, puede mantenerse como en la fase de *trapping* o incluir el protocolo típico para estudio de canales de sodio, con el que se mantiene a la membrana en un potencial de 90 mV 10 ms, se hiperpolariza a 120 mV durante 100 ms asegurándonos de que todos los canales de sodio están cerrados, despolarizamos al potencial de máxima corriente en las curvas I-V, a 30 mV durante 30 ms y se vuelve a 90 mV 30 ms más.

Data Acquisition

Durante la última fase, los compuestos en los reservorios de C1-C8, bañan las células y se efectúa el registro de corrientes. Por este motivo los ajustes de presión deben centrarse en que el flujo de los compuestos y del canal principal no arrastren las células retenidas en las micropipetas de las trampas y por tanto también dependerá de la línea celular a estudio. Además, las corrientes de flujo laminar del canal principal y de los compuestos circulan al

mismo tiempo en dos niveles, por lo que hay que asegurarse de que no haya difusión y no se diluyan los compuestos. El tiempo de aplicación marcará la duración del experimento por lo que estará condicionado con el tiempo de liberación de los compuestos programado en la misma ventana del “editor de presión”, y que dependerá del experimento y/o de los compuestos a estudiar (ya explicado en la sección de “diseño del protocolo experimental”). De forma general, para las líneas HEK y HEKNav1.1wt el canal principal tendrá una presión positiva de flujo de 0.15 psi y en las trampas una presión de succión mantenida de 5 inHg (Fig. AI-14A) Para las CHO y CHONav1.6wt, la presión del canal principal será igual, pero en las trampas, la presión negativa bajará a los 100 s a 4 inHg debido a su menor tamaño (Fig. AI-14B) En todos los casos, la presión positiva del flujo de compuestos que se ajusta en el editor de compuestos, será de 6 psi.

Para esta tesis doctoral se han realizado diferentes protocolos experimentales que se describirán de forma independiente en los siguientes apartados: caracterización electrofisiológica y farmacológica de las líneas, cribado masivo de la librería de compuestos y estudio de los candidatos seleccionados.

A) AMPLITUD DE CORRIENTE Y CURVAS DE ACTIVACIÓN E INACTIVACIÓN

La amplitud de corriente se obtiene graficando la corriente que cruza la membrana celular en cada valor del potencial de membrana. Estas gráficas se llaman curvas corriente-voltaje o I-V y responden a la Ley de Ohm ya que la célula y el equipo de medida actúan como un circuito equivalente. Estos datos nos permitirán saber a qué potencial la corriente iónica a través de la membrana es máxima. Para ambas líneas se aplicaron subprotocolos de pulsos despolarizantes de 10 mV durante 20 ms desde 90 mV hasta +50 mV (Fig. AI-15A).

Las curvas de activación vienen dadas por la relación entre la conductancia normalizada y el voltaje. La conductancia G , se obtiene utilizando la siguiente fórmula:

$$G = - \frac{I}{(V - V_{eq})} \quad \text{Ecuación 2}$$

dónde G es la conductancia, I es el valor de la corriente medida para cada pulso de voltaje V y V_{eq} es el potencial de equilibrio del Na^+ dado por la ecuación de Nernst:

$$V_{eq} = -\frac{RT}{z_x F} \cdot \ln \frac{c_x^i}{c_x^e} \quad \text{Ecuación 3}$$

siendo z_x la carga del ion Na^+ , c_x^i es la concentración intracelular de Na^+ (en la solución interna), c_x^e es la concentración extracelular de Na^+ (en la solución externa). El valor de RT/F a 25°C es 25.6 mV .

Las curvas $G/G_{m\acute{a}x}$ - V , se ajustaron a la ecuación de Boltzmann:

$$\frac{G}{G_{m\acute{a}x}} = \frac{G_{m\acute{i}n}}{G_{m\acute{a}x}} + \frac{\left(1 - \frac{G_{m\acute{i}n}}{G_{m\acute{a}x}}\right)}{\left(1 + e^{\frac{z_g \cdot (V - V_{0.5})}{KT}}\right)} \quad \text{Ecuación 4}$$

dónde $G_{m\acute{a}x}$ es la conductancia máxima obtenida, $G_{m\acute{i}n}$ es la conductancia mínima obtenida, $V_{0.5}$ es el voltaje requerido para activar la mitad de la conductancia máxima, z_g es la carga de apertura, T es la temperatura absoluta y K es la constante de Boltzmann.

Las curvas de inactivación se obtuvieron aplicando un protocolo de pulsos despolarizantes de 10 mV desde -90 mV a $+50 \text{ mV}$ durante 100 ms , tiempo suficiente para asegurar la inactivación de los canales Nav. El pulso de medida inmediato posterior fue de 50 ms a -30 mV para HEKNav1.1wt y CHONav1.6wt y -10 mV para CHO (Figs. AI-15B y AI-15C).

Las curvas $I/I_{m\acute{a}x}$ - V se ajustaron a la ecuación de Boltzmann:

$$\frac{I}{I_{m\acute{a}x}} = \frac{I_{m\acute{i}n}}{I_{m\acute{a}x}} + \frac{\left(1 - \frac{I_{m\acute{i}n}}{I_{m\acute{a}x}}\right)}{\left(1 + e^{\frac{z_g \cdot (V - V_{0.5})}{KT}}\right)} \quad \text{Ecuación 5}$$

dónde $I_{m\acute{a}x}$ es la intensidad máxima obtenida, $I_{m\acute{i}n}$ es la intensidad mínima, $V_{0.5}$ es el voltaje requerido para inactivar la mitad de la corriente máxima, z_g es la carga de apertura, T es la temperatura absoluta y K es la constante de Boltzmann.

B) CONTROLES, DETERMINACIÓN DEL FACTOR Z Y CRIBADO NIHCC

Para registrar la actividad de las moléculas de la librería NIHCC seleccionada para el cribado (detalles en el apartado de Químicos), se diseñó un protocolo de medida de un único pulso por *sweep*. Se mantenían las células a -90 mV durante 100 ms, despolarizando a -30mV durante 20 ms y se regresaba a potencial mantenido de -90 mV otros 30 ms. Debido a la corta duración de los pulsos, intrínseco a la rápida cinética de los canales de sodio, el ratio de registros para estos experimentos era de 10 KHz. Con una frecuencia menor, podría perderse información de las medidas (Fig. AI-16). Los compuestos (C1-C7) bañaban a las células durante 60 s, y un lavado con buffer entre ellos de 60s (C8), comenzando la adición de C1 a los 360 s para permitir la estabilización de los sellos (Fig AI-18)

Este mismo protocolo de voltaje se utilizó para elegir los activadores y bloqueadores de canales de sodio que queríamos como controles, y estudiar el factor Z.

Este factor Z, es una medida estadística del efecto del tamaño de una población, indispensable para los cribados de alto rendimiento²¹⁰, siendo su ecuación:

$$Z = 1 - \frac{3(SD_{max} + SD_{min})}{|Media_{max} - Media_{min}|}$$

Ecuación 6

Donde, SD se refiere a la desviación estándar, de los valores de señal máxima con solución externa y mínima con lidocaína 1mM, un bloqueador suave similar a los compuestos que podrían seleccionarse como candidatos, y sus medias. Se tomaron valores de incrementos de corriente con solución externa y con lidocaína, de la misma placa (explicado en la sección de resultados). Además, estos valores se representaron utilizando GraphPad, normalizando a un

100% de actividad la señal con la solución externa, y analizado estadísticamente utilizando un test *t de Student*, siendo $P < 0.05$ estadísticamente significativo.

Para el análisis de los datos crudos obtenidos en tablas de Excel desde la herramienta de “*Data analyzer*”, se calculó el área bajo la curva del registro desde el momento en el que comienza el pico de corriente hasta el final del barrido, ya que nos permite observar efectos remanentes de los compuestos testados. El área se calculó como un sumatorio de cada valor de la intensidad de corriente (ordenadas) durante el tiempo precisado (abscisas). El valor global obtenido fue relativizado, por división, al valor obtenido en el momento inmediato anterior a la adición del compuesto, en el que se habrá aplicado solo solución externa y será nuestro valor basal de corriente. Así obtendremos valores iguales, mayores o menores de la unidad. A esto lo llamaremos Actividad Relativa del Canal e indicará si es igual a uno, que el compuesto no modifica la actividad del canal, mayor que uno estaremos ante un activador y menor que 1 ante un bloqueador.

$$\text{Actividad Relativa Canal} = \frac{(\sum_{i=1}^N I_i \Delta t)_{\text{compuesto}}}{(\sum_{i=1}^N I_i \Delta t)_{\text{solución externa}}} \quad \text{Ecuación 7}$$

Para normalizar esta Actividad Relativa, ajustamos todos los valores obtenidos entre 0% que será la señal obtenida con TTX 100 nM ya que es nuestro control de bloqueo completo, y 100% que será la máxima actividad del canal en condiciones normales. Así obtendremos el % de la Actividad Relativa del canal y nos servirá para, de forma rápida, visualizar la actividad de todos los compuestos del cribado.

$$\% \text{ Actividad Relativa Canal} = \frac{\text{Actividad}_{\text{compuesto}} - \text{Actividad}_{\text{TTX}}}{\text{Actividad}_{\text{solución externa}} - \text{Actividad}_{\text{TTX}}} * 100 \quad \text{Ecuación 8}$$

Los datos de la actividad relativa del canal como su valor normalizado se ajustaron a gráficas de columnas. Para aquellos experimentos en los que se obtuvieron réplicas, los datos fueron trabajados estadísticamente mediante análisis simple de las varianzas (ANOVA *one-way*), seguida de un test de comparación múltiple de Dunnet, de cada columna con la columna control de la señal con solución externa. Se representó la media \pm SEM.

C) ENSAYOS DE DOSIS-RESPUESTA

Los protocolos de los pulsos de voltaje fueron los mismos que para el cribado de los descritos en el apartado B (Fig. AI-16). La adición de compuestos se modificó ligeramente, siendo ahora el lavado con buffer de 120 s y adelantando a 300 s el comienzo de la adición de C1 (Fig. AI-18).

Los datos crudos obtenidos con la herramienta del “*Data analyzer*”, fueron trabajados en Excel y Graph Pad Prism, para obtener la Actividad Relativa del Canal y el % Actividad Relativa del Canal, siguiendo las ecuaciones anteriores. De la misma forma se representaron en gráficos de columnas como media \pm S.E.M y se analizaron estadísticamente mediante análisis simple de las varianzas (ANOVA *one-way*), seguida de un test de comparación múltiple de Dunnet, de cada columna con la columna control de la señal con solución externa, siendo $P < 0.05$ indicativo de diferencia significativa. En todos los casos se mantuvo un $n_{\text{total}} \geq 9$ y $N \geq 3$.

Para el caso de la dosis-respuesta de TTX, buscamos la IC_{50} , por lo que, además de representar los datos en gráficos de columnas, representamos como una ecuación sigmoidea ajustando, los valores normalizados, a la ecuación logarítmica de Hill:

$$\% \text{ Actividad Relativa del Canal} = \frac{1}{(1 + 10^{(x - \log IC_{50})})^{n_H}} \quad \text{Ecuación 9}$$

Dónde, IC_{50} es la mitad de la máxima concentración inhibitoria y n_H es el coeficiente de Hill que describe la cooperatividad de la unión del ligando. En este caso se obtuvo $n_{\text{total}} \geq 7$ con $N = 3$.

5 QUÍMICOS

Las neurotoxinas y fármacos que tienen como diana los canales de sodio se pueden incluir en distintos grupos según sus sitios de unión ^{37, 211}. En la tabla 2 que se muestra en la introducción, se profundiza en esa clasificación.

5.1 Lidocaína

La lidocaína o lignocaína es un anestésico local y un agente antiarrítmico, del tipo aminoamida, que fue sintetizado y comercializado por primera vez en los años 40. Esta molécula anfipática actúa como bloqueador de canales de sodio dependientes de voltaje. Su anillo aromático hidrofílico permite su paso a través de la membrana de la célula y su grupo amino hidrofílico es el responsable de la unión al canal ²¹². Se ha descrito el sitio 9, los segmentos S6 de 3 dominios de la subunidad alfa del canal, DI, DIII y DIV, como el de unión a anestésicos locales, anticonvulsivos, antiarrítmicos y antidepresivos ^{37, 213}. A diferencia de la Tetrodotoxina, tiene una interacción similar con todos los Nav, ya sean cardíacos, nerviosos o de músculo esquelético ²¹⁴, aunque es efectiva a diferente orden de magnitud según uso, siendo entre 5-20 μM ^{215, 216} las concentraciones usadas como antiarrítmico y $>100 \mu\text{M}$ usado como anestésico local ^{217, 218}.

El stock de lidocaína (Sigma) fue preparado a 1mM en 100% etanol absoluto (Sigma) y utilizado a diferentes concentraciones según el ensayo lo que se indicará en el apartado de resultados correspondiente.

5.2 TTX

La tetrodotoxina ó tetrodotoxina, TTX, es una neurotoxina hidrofílica por su estructura tricíclica con un grupo guanidinio cargado positivamente a pH fisiológico, entrando por este motivo en el grupo de toxinas guanidinas (Fig. 12). Inicialmente se dio a conocer por el animal del que proviene, el pez globo o fugu, 121 especies que pertenecen a la familia

Tetraodontidae, y de ahí su nombre. A pesar de esto, se ha visto que los peces globo criados en cautividad no la producen y se ha detectado su presencia también en otros animales marinos, como algunos pulpos o peces gobios y ciertas especies de anfibios como los tritones e incluso en algunas bacterias, por lo que se sospecha que la TTX podrían adquirirla a través de la cadena alimentaria, sufriendo sus canales de sodio mutaciones adaptativas para ser resistentes a TTX ²¹⁹.

Esta potente neurotoxina, mimetiza el ion sodio hidratado, uniéndose con una alta afinidad ($K_d = 10^{-10}$ M) al sitio 1 de los canales Nav, es decir, en los *p-loop* extracelulares de los 4 dominios del canal. Se forma un enlace iónico entre el grupo guanidinio y la carga negativa de un glutamato, provocando cambios conformacionales en la proteína, quedando la toxina unida electrostáticamente al canal abierto ocluyendo el poro e impidiendo la entrada de sodio a la célula excitable y por tanto la generación y propagación del potencial de acción ^{36, 37, 220}.

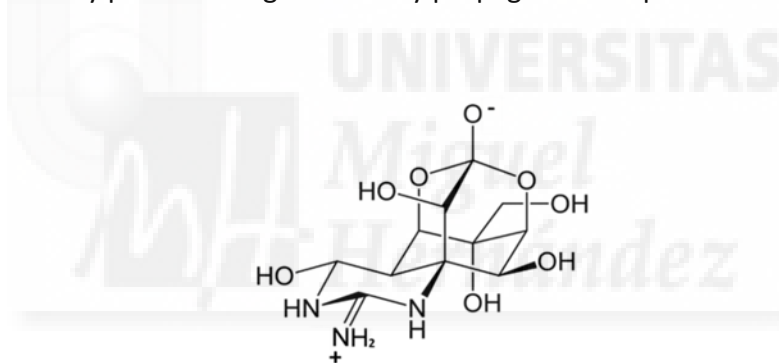


Figura 12. Estructura molecular de la TTX

Las 9 isoformas de la familia de canales de sodio dependientes de voltaje pueden clasificarse según su sensibilidad a TTX y su influencia en los parámetros biofísicos de estos canales está ampliamente estudiada ^{36, 74, 211, 221}. Por este motivo hemos utilizado esta toxina para la caracterización farmacológica de nuestras líneas celulares (Tabla 7).

Tabla 7. Características de los canales Nav1.1 y Nav1.6. (Adaptado de Vacher et al., 2008; Clare et al., 2005; Goldin, 2001; Mantegazza et al., 2012^{27, 32-34})

Proteína	Gen	Cromosoma	Tejidos	Localización subcelular	TTX IC ₅₀
Nav1.1	SCN1A	2q24.3	Cerebro, espina dorsal	Soma, dendritas, algún axón	5-10 nM
Nav1.6	SCN8A	12q13.13	Cerebro, espina dorsal, glia, DRGs	Axón, Somatodendritas	2-10 nM

La tetrodotoxina (Abcam, Cambridge, UK) fue obtenida cumpliendo todos los procedimientos legales asociados a toxinas y otras sustancias con alto riesgo biológico. El stock de tetrodotoxina fue preparado resuspendiendo el liofilizado, en campana de gases, a 1mM en 100% tampón citrato a pH 4.8 (Sigma) y utilizado a diferentes concentraciones según el ensayo.

5.3 Veratridina

La veratridina es un alcaloide derivado de esteroides que se obtiene de plantas de los géneros *Veratrum* y *Schoenocaulon*, ambos pertenecientes a la familia Melanthiaceae. Esta molécula pertenece a una clase de neurotoxinas lipofílicas que incluye la batracotoxina, aconitina, grayanotoxina y algunos insecticidas^{47, 211, 222}. Estas toxinas son llamadas activadores o agonistas de canales de sodio ya que promueven su apertura por despolarización del potencial de reposo de la membrana. El mecanismo de cómo actúan estas toxinas es aún desconocido, pero estudios de mutagénesis parecen indicar que, por ejemplo, para la veratridina y la BTX, el sitio 2 en los segmentos S6, es el sitio de unión a la subunidad alfa de los Nav y resulta estar muy próximo al de algunos fármacos como anestésicos locales, antidepresivos o antiepilépticos³⁷.

La veratridina (Abcam, Cambridge, UK), fue obtenida cumpliendo todos los procedimientos legales asociados a toxinas y otras sustancias con alto riesgo biológico. Se recibió liofilizada y fue resuspendida en campana de gases, con DMSO estéril, a una concentración de 100 mM. Se utilizó a distintas concentraciones según el experimento a realizar y se indicará en el párrafo correspondiente.

5.4 ATX-II

Quisimos aprovechar la oportunidad de que nuestra línea HEKNav1.1wt se hubiera utilizado en el estudio de la actividad de distintas toxinas de anémonas marinas sobre Nav1.1-Nav1.6¹⁹⁵. Según los resultados obtenidos en este estudio, se decidió tomar como uno de los controles positivos de activación de Nav, la ATX-II, péptido obtenido de la *Anemona sulcata*. Esta toxina tiene por sitio de unión el giro extracelular S3-S4 del dominio IV del canal de los canales de sodio dependientes de voltaje, conocido como sitio 3, lo que retrasa la inactivación y por tanto prolonga el potencial de acción.

ATX-II (EMD Millipore), fue obtenida cumpliendo todos los procedimientos legales asociados a toxinas y otras sustancias con alto riesgo biológico. Se recibió liofilizada y fue resuspendida en campana de gases, con agua bidestilada estéril, a una concentración de 100 μ M. Se utilizó a distintas concentraciones según el experimento.

5.5 NIHCC; National Institute of Health Clinical Collection

Esta quimioteca está compuesta por 747 pequeñas moléculas bioactivas, que, o bien son ya fármacos genéricos libres de patente, o son fármacos potenciales que han estado en fases I-III de ensayos clínicos, habiendo superado las pruebas de farmacocinética y farmacodinámica, así como los perfiles de seguridad toxicológica. Esta colección de moléculas pertenece al *NIH Roadmap Molecular Libraries Screening Centers Network (MLSCN)*, una iniciativa del Instituto Nacional de salud de Estados Unidos para favorecer el descubrimiento de nuevos usos terapéuticos de moléculas ampliamente conocidas y facilitar un punto de partida para la optimización de la química médica. Toda la información está disponible en la página web del NIH (https://mlsmr.evotec.com/MLSMR_HomePage/contacts.html)

Estos 747 compuestos se almacenan en placas especiales de 96 pocillos a una concentración de 10 mM 100% DMSO, distribuidos en dos series, NGP 104-01 a 104-06 (456 moléculas) y NGP 201-01 a 201-04 (291 moléculas). En el cribado fueron testados a 100 μ M y 1%DMSO, por adición de 2.5 μ L a un total de 247.5 μ L de solución externa añadidos previamente a los pocillos de la placa de trabajo.

Los 4 candidatos seleccionados para validación (véase la sección de resultados), fueron obtenidos de Tocris:

Amlexanox es un fármaco que ha sido utilizado, durante 20 años, de forma oral, para las úlceras bucales. Además se ha visto que es un inhibidor de la síntesis y liberación de algunos mediadores inflamatorios ²²³, inhibidor de la síntesis de histamina, por lo que parece tener actividad antialérgica en ratas ^{224, 225}. Un estudio propone el Amlexanox como tratamiento para enfermedades de origen genético ya que es capaz de “corregir” las mutaciones con pérdida de la pauta de lectura debido a que obliga al ribosoma a “saltar” el final prematuro introduciendo un aminoácido al azar ²²⁶. Existe una patente sobre pequeñas moléculas para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la subunidad alfa de canales de sodio dependientes de voltaje en la que aparece el Amlexanox ²²⁷.

Amlexanox (Tocris), fue resuspendido en DMSO a 100 mM y almacenado a -20 °C.

Olmesartan, es un fármaco utilizado comúnmente como tratamiento de la hipertensión. Está incluido en la familia de los llamados antagonistas de los receptores tipo 1 de angiotensina II, los AT1, de las células musculares lisas de los vasos sanguíneos. La angiotensina II y la unión a su receptor específico, son parte fundamental del sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona, sistema hormonal responsable de la regulación del equilibrio hídrico y electrolítico, así como de la presión arterial. La unión de la angiotensina II a su receptor tiene un efecto vasoconstrictor, por liberación de calcio del retículo sarcoplásmico, vía Inositol trifosfato (IP3).

Los receptores de angiotensina (AT) han sido recientemente incluidos como dianas moleculares para desórdenes neuropsiquiátricos ya que el cerebro tiene su propio sistema Renina-angiotensina, y parece que está implicado en la regulación del flujo sanguíneo, estrés, depresión, nocicepción, además de convulsiones y consolidación de la memoria, por lo que puede tener un importante papel en la etiología de enfermedades como Alzheimer, Parkinson o diversas epilepsias^{228, 229}. La Angiotensina II parece tener un papel neurotransmisor en el SNC regulando la liberación de otros NT como GABA, noradrenalina, acetilcolina, inhibiendo, por ejemplo, la transmisión sináptica GABAérgica de neuronas de la materia gris. El hecho de

bloquear los AT1 disminuye los niveles de glutamato y eleva los de GABA pudiendo favorecer la prevención de convulsiones^{230, 231}. Diversos estudios en modelos animales de epilepsia, sugieren que los antagonistas de AT1, entre ellos Olmesartan, muestran actividad anticonvulsiva y podrían tener efecto neuroprotectivo disminuyendo las secuelas ya que parece que AT1 está sobre regulado tras sucesivas crisis convulsivas²³²⁻²³⁵.

Olmesartan Medoxomil (Tocris), fue resuspendido en DMSO a 100 mM y almacenado a -20°C.

Miglitol, es un iminoazúcar que actúa como un inhibidor reversible competitivo de las enzimas α -glucosidasas intestinales evitando la hidrólisis de disacáridos y oligosacáridos a sus monosacáridos. Se utiliza para retrasar la absorción de glucosa en enfermos diabéticos no insulino dependientes disminuyendo la hiperglucemia posprandial.

Miglitol (Tocris), se recibió liofilizado y fue resuspendido a 100 mM en H₂O bidestilada y guardado a -20°C.

HTMT (Histamina trifluorometil toluidide), es un derivado de la histamina y agonista de los receptores de histamina H1 y H2²³⁶. Encontramos estos receptores en todas las células del sistema inmune, SNC, células musculares lisas de vías aéreas y vasculares, células endoteliales, células de la mucosa gástrica, corazón, etc. La unión de histamina a estos dos receptores induce la actividad proinflamatoria por la liberación de calcio del retículo al citoplasma vía IP3²³⁷.

HTMT dimaleato (Tocris), se recibió liofilizado y fue resuspendido a 100 mM en H₂O bidestilada y guardado a -20°C.

Para los ensayos de dosis-respuesta de los candidatos seleccionados, las diluciones se prepararon, en tubos mediante dilución seriada, en solución externa, a 0.1 nM, 1nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M ,10 μ M y 100 μ M.

5.6 THC-CL1

Extracto natural, seleccionado por la compañía Theracule Pharma de Luxemburgo por sus efectos anticonvulsivos *in vivo*, en pez cebra y ratón. Fue recibido a 10 mM en 100% DMSO, y probado en dosis-respuesta a 0.1 nM, 1nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M ,10 μ M y 100 μ M, preparados mediante dilución seriada en solución externa.



RESULTADOS

1 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LAS LINEAS CELULARES

Las propiedades electrofisiológicas de los canales de sodio sensibles a voltaje dependen del tipo celular en el que se estudien y de si el sistema heterólogo se construye con las subunidades auxiliares beta además de la subunidad principal alfa.

La expresión en oocitos de *Xenopus*, de la subunidad α del Nav1.2, provoca corrientes de activación e inactivación más lentas que cuando es cotransfectada con las subunidades auxiliares $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$ ^{53-55, 238, 239}. Enfocando en líneas celulares de mamífero, las subunidades alfa de los canales Nav son capaces de formar por si solas canales “*fast-inactivating*”²⁴⁰, pero varios estudios confirman que el comportamiento del canal dependerá del *background* de la célula utilizada. Por ejemplo, hay constancia de la predisposición a generar corrientes persistentes de canales recombinantes transfectados en células HEK²⁴¹⁻²⁴³, pero no cuando se transfectan en células CHO²⁴⁴, ambas descritas en la sección de materiales y métodos. Además, la coexpresión de las subunidades auxiliares β , desplaza la inactivación dependiente de voltaje del estado de reposo a, por ejemplo, potenciales más positivos si se utiliza la línea huésped HEK²⁴³ o más negativos si se utiliza CHL (*Chinese hamster lung cell line*)²⁴⁵.

Se había hipotetizado la posibilidad de que en células transfectadas con la subunidad principal α , se expresase una subunidad $\beta 1$ endógena, de forma constitutiva o inducida por la transfección²⁴⁶, aunque se demostró mediante *Nothern blot* e *Inmunoblot* que, al menos la línea CHO no la expresaba²⁴⁵. Algunos años más tarde se determinó que la subunidad $\beta 1$ posee una variante de *splicing*, con la que comparte la secuencia *Ig-like*, denominada $\beta 1A$, de 26 kDa presente durante el desarrollo embrionario, pero que, al menos, en ratas adultas también se expresa en glándulas adrenales, músculo esquelético y corazón⁵⁷. La expresión de esta subunidad $\beta 1A$ también se ha demostrado en células HEK, pudiendo esta variante modular, igual que la $\beta 1$, la inactivación del canal⁵⁸.

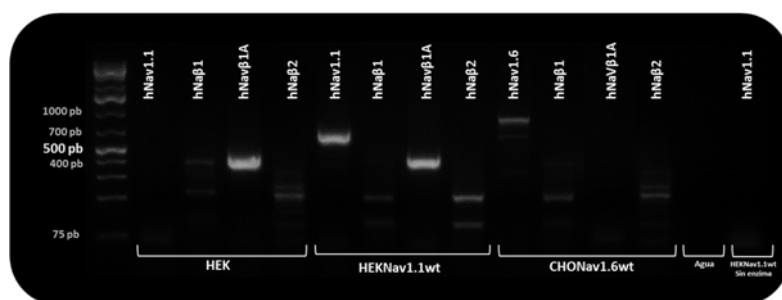
RESULTADOS

Basándonos en estos datos y debido a que las líneas HEKNav1.1wt y CHONav1.6wt, que se van a utilizar en este estudio, habían sido donadas, quisimos examinar si efectivamente estas expresaban las subunidades alfa de los canales de interés y si estas se habían generado también con las subunidades auxiliares $\beta 1$ o $\beta 1/\beta 2$. Además, aprovechando la información de Moran et al.,⁵⁸, se buscó la presencia de la variante de *splicing* de $\beta 1$. La línea huésped HEK sirvió como control negativo de expresión de los canales Nav1.1 y Nav1.6. Se utilizó un sistema nativo, cerebelo de ratón^{27, 170, 247}, como control positivo de expresión de las subunidades principales de Nav1.1 y Nav1.6 y las auxiliares $\beta 1$ y $\beta 2$. La presencia o ausencia de los ARNm buscados se muestran en los gels de agarosa de la figura 13. El tamaño esperado de las bandas se resume en la tabla 8.

Tabla 8. Tamaño esperado de los transcritos amplificados mediante PCR

Proteína	hNav1.1	hNav1.6	hNav β 1	hNav β 1A	hNav β 2	mNav1.1	mNav1.6	mNav β 1	mNav β 2
Secuencia amplificada (pb)	679	841	600	400	640	737	817	457	720

A



B

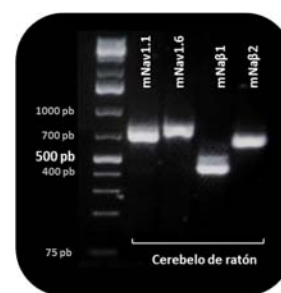


Figura 13. Expresión de ARN mensajero de Nav1.1 y Nav1.6 en líneas celulares y cerebelo de ratón. A) Gel de agarosa con los transcritos obtenidos de las líneas celulares, de las subunidades α y β de los canales humanos, Nav1.1 y Nav1.6. B) Gel de agarosa con los transcritos amplificados en cerebelo de ratón.

La electroforesis en gel de agarosa de las muestras de ADNc mostró la presencia de las subunidades alfa de hNav1.1 (679 pb) y hNav1.6 (841 pb) en las líneas HEKNav1.1wt y CHONav1.6wt, respectivamente, pero no se observaron las bandas de expresión de h β 1 (600 pb) y h β 2 (640 pb). La expresión constitutiva de h β 1A (400 pb) descrita por Moran et al., se confirmó en HEK y HEKNav1.1wt. La no presencia de la banda de hNav1.1 en la reacción con HEKNav1.1 sin enzima nos sirvió de control negativo. Se obtuvieron algunas bandas inespecíficas, que claramente no pertenece a los transcritos buscados, debido a que las diferencias en las temperaturas de hibridación de los cebadores (T_m), obligó a seleccionar una temperatura de hibridación para el programa de PCR más baja de lo requerido para ser restrictiva. Respecto a los transcritos de ratón, se obtuvieron las 4 bandas con los tamaños esperados confirmando la expresión en el sistema nativo de los canales mNav1.1 (737 pb) y mNav1.6 (817 pb), y las subunidades auxiliares h β 1 (457 pb) y h β 2 (720 pb).



2 FLPR[®] POTENCIAL DE MEMBRANA

Durante la puesta a punto del método de *patch-clamp* automático, se decidió probar una técnica alternativa, basada en medidas de fluorescencia, para detectar cambios en el potencial de membrana debido a compuestos que modulan o bloquean canales iónicos dependientes de voltaje. Ante una despolarización de la membrana celular, la sonda permea (sigue a los iones positivos) y se aleja del *quencher*, comenzando a emitir fluorescencia. Tras una hiperpolarización, la sonda vuelve a salir acercándose al *quencher* y disminuyendo la señal fluorescente.

Ambas líneas celulares, HEKNav1.1wt y CHONav1.6wt, se incubaron con la sonda y se tomaron medidas de fluorescencia basal durante 5 ciclos. Tras aplicar los compuestos y sus vehículos, se registraron 5 ciclos más y se realizó la inyección de veratridina 100 μM para despolarizar la membrana. Finalmente se midió la fluorescencia hasta saturación, observada tras otros 5 ciclos (Fig. 14).

Los controles utilizados para los ensayos de fluorescencia, ya explicados detalladamente en la sección de materiales y métodos fueron, TTX 50 y 100 nM y lidocaína 100 μM , 500 μM y 1 mM como controles de inhibición o bloqueo y ATX-II 100 nM, 500 nM y 2 μM como activador conocido de canales de sodio.

Los resultados obtenidos fueron los esperados en cuanto a los inhibidores utilizados, TTX y lidocaína, provocando una disminución en la emisión de fluorescencia respecto al tratamiento con buffer o con los vehículos. En presencia de TTX, la fluorescencia registrada se asemeja a la línea control sin inyección de veratridina (Fig. 32A y 32B). En cuanto a los activadores, ambos actúan de forma diferenciada sobre el canal incrementado la corriente por retrasar la inactivación del canal estando por tanto más tiempo abierto, pero no incrementado la intensidad o conductancia del mismo (explicado en materiales y métodos)^{195, 211}. Se confirmó que la veratridina provoca la apertura de los canales de sodio (estímulo despolarizante) ya que su acción se ve afectada parcial o totalmente con los inhibidores

utilizados. La emisión de fluorescencia en presencia de ATX-II, superó la registrada con su vehículo o con buffer (Fig. 32C)

La actividad relativa de ambos canales mostró que ATX-II, provoca que Nav1.1 supere el 100% sin importar la dosis, por lo que suponemos que esta toxina, al inactivar el cierre del canal, actúa sinérgicamente junto la veratridina, permitiendo que entre más sonda en la célula y por tanto aumente la emisión. Este resultado en el Nav1.6wt, solo lo observamos con la concentración más alta de ATX-II. Efectivamente la lidocaína, utilizada habitualmente como analgésico local, bloquea la apertura de los canales con mucha menos efectividad que la TTX, observándose dosis-respuesta para TTX y lidocaína en Nav1.1 y Nav1.6. (Fig. 15)



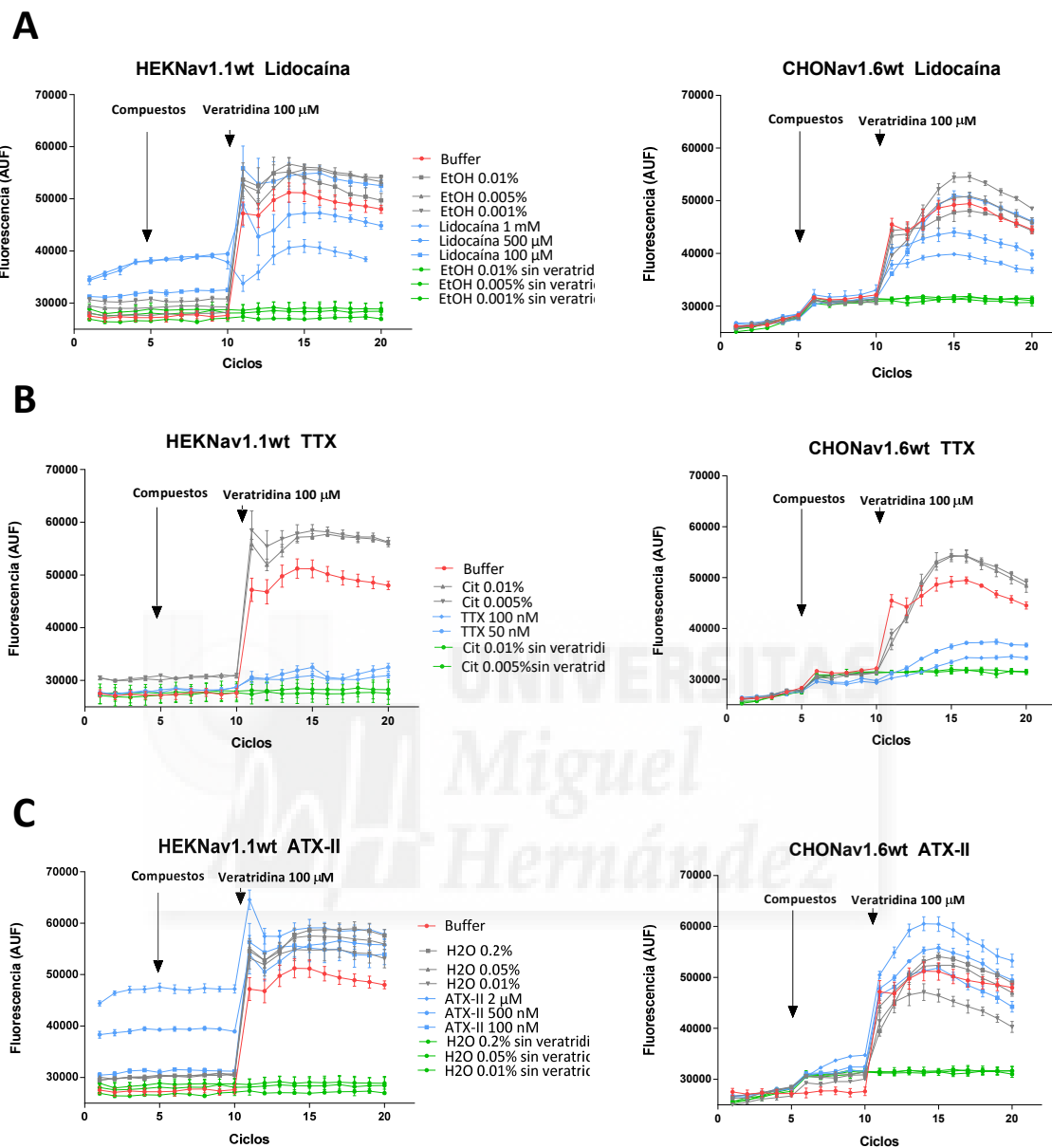


Figura 14. Registros de fluorescencia del ensayo FLPR® con las líneas HEKNav1.1wt y CHONav1.6wt. A la izquierda se muestran los registros de fluorescencia para la línea HEKNav1.1wt, una por compuesto control utilizado a diferentes concentraciones y sus vehículos. A la derecha las homólogas para CHONav1.6wt. En el ciclo 5 se procede a la adición de los compuestos a testar y en el ciclo 10 se inyecta veratridina 100 μ M como método de despolarización de la membrana celular. En rojo se muestra el control con buffer, en azul los compuestos a distintas concentraciones, en gris sus vehículos y en verde el control de los vehículos sin la inyección de veratridina en el ciclo 10. Los valores pertenecen a un único ensayo con n=3, y se representa la media \pm SEM. A) Lidocaína y etanol. B) TTX y tampón citrato. C) ATX-II y H₂O.

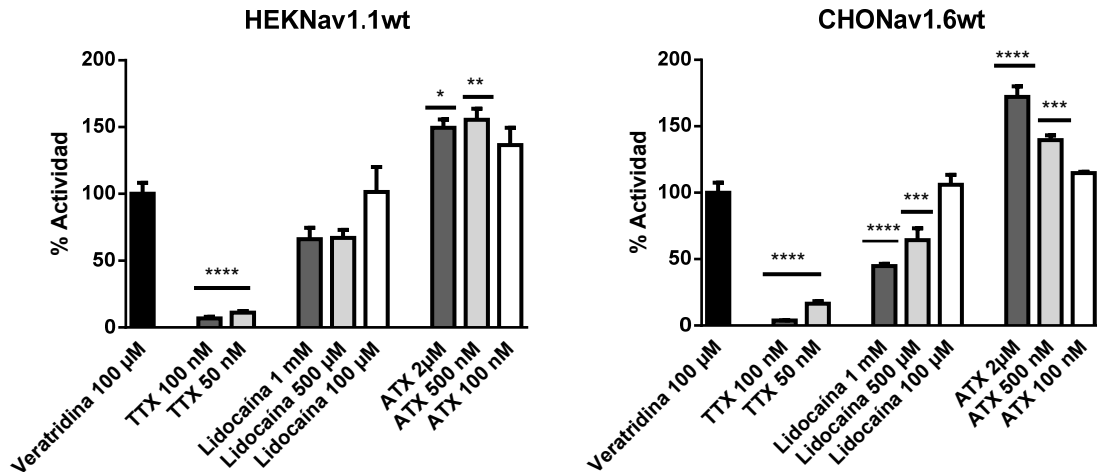


Figura 15. Actividad relativa de los canales por fluorometría. Se toman incrementos de fluorescencia, respecto de su línea basal y se normaliza con sus vehículos. Para obtener el % de actividad del canal se ajustan los valores tomando como referencia el 100% de actividad de los canales el obtenido con el buffer y la inyección de veratridina. Se observa la disminución de actividad con los bloqueadores, lidocaína a 500 nM y 1 mM y TTX a ambas concentraciones, de manera dosis dependiente. La ATX-II, muestra claramente un aumento de la actividad de ambos canales al superar el 100% de actividad. Se representa la media \pm SEM, n=3 ; **** p< 0.0001. Análisis simple de varianzas, ANOVA, seguido de un test de comparación múltiple de Dunnet de cada columna con veratridina 100 µM.

Concluimos que esta técnica podría ser utilizada para un pre-cribado de compuestos, principalmente para buscar bloqueadores el Nav1.6wt, ya que, debido a la rápida cinética de los canales de sodio, los posibles activadores del Nav1.1 actuarán como ATX-II, incrementando la corriente por mantener el canal abierto durante más tiempo, pero no aumentando la intensidad o conductancia del mismo, lo que dificultaría su detección.

Aunque se decidió no continuar con este ensayo en vista de que se comenzaba a tener reproducibilidad en la ejecución de los ensayos con Ionflux™, nuestros resultados indicaban que este es un buen método alternativo y sencillo para refrendar los datos obtenidos por técnicas electrofisiológicas.

3 PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO DE MEDIDA IONFLUX™ Y ANÁLISIS

3.1 Protocolos de medida y cultivo celular

La plataforma automática de *patch clamp* y su método de medida fueron adaptados a las líneas celulares de las que se disponía. Desde el inicio de esta tesis doctoral, la técnica ha crecido en precisión y exactitud con mejoras tanto del software (con 4 actualizaciones) y los protocolos de medida según el tipo celular, como de los protocolos de cultivo celular y tratamiento pre-experimento de las células (algunas de ellas por aportaciones de los propios usuarios).

Las dificultades iniciales fueron la ausencia de sellos y la imposibilidad en muchos ensayos de registrar corriente por lisis celular al entrar en *whole-cell*. Ambas situaciones son comunes en la técnica de *patch-clamp*, ya que el éxito depende en gran medida del estado de la membrana de la célula y esto a su vez depende de variedad de factores, desde la confluencia del cultivo y el tiempo de proliferación de las células post-tripsinización, el número de pases desde descongelación, etc.

Tabla 9. Variables testadas durante la puesta a punto del método

Variables	Ensayado	Mejores resultados HEK Nav1.1wt	Mejores resultados CHONav1.wt
Tipo de frasco	T75 cm ² ; T150 cm ² ; T175cm ²	T175 cm ²	T175 cm ²
Pases en cultivo	1 a 20	> 5 pases	> 2 pases
Días de incubación a 37 °C	1 día - 7 días	48 h	48 h
Días de incubación a 30 °C	1-3 días	48 h	48 h
Confluencia %	50 % - 100 %	50-60%	90-100%
Adherencia celular	Tripsina/Acutasa/Detachin™	Detachin™	Detachin™
Agitación CHO-free media	si/no	si	si
Cel/pocillo /250µL	6 x10 ⁵ - 2x10 ⁶ cel.	6-8 x10 ⁵ cel.	1-1.5x10 ⁶ cel
Protocolo Ionflux	Comercial+8modificados	Modificado	Modificado
C _{slow} sustracción	0% - 100%	Según ensayo ; aprox.70%	Según ensayo ; aprox. 60%
P/N sustracción	Activado / No Activado	Sin diferencias	Sin diferencias
R _{series} sustracción	0% - 100%	Según ensayo	Según ensayo

Hasta la obtención de ensayos reproducibles, en los que se consiguieron registros aptos para ser analizados, diversas variables fueron testadas, todas ellas resumidas en la tabla 9 y descritas brevemente continuación:

- ❖ **Frasco T175 cm².** Se comprobó que, para la línea celular HEKNav1.1wt el hecho de proliferar en una mayor superficie y con una confluencia máxima del 60%, disminuía la formación de agregados al ser levantadas para el ensayo y parecía que además mejoraba el estado de la membrana.
- ❖ **Células tras tripsinización mínimo 48 horas a 37°C.** Parece que esto favorecía la recuperación de la célula de la agresión enzimática y por tanto la expresión del canal y su llegada a membrana.
- ❖ **Células a 30°C durante 48 h.** Se ha publicado que la incubación a 30 °C de las células, los días anteriores al ensayo, rescatan la actividad de Nav1.6 con mutaciones de pérdida de función aumentando también la intensidad de corriente en el canal silvestre, sin verse, en ninguno de los dos casos, modificados los parámetros biofísicos

de las curvas de activación e inactivación. Estos sucesos eran consistentes con la idea de que aumenta el tráfico del canal desde RE incluso en el canal mutado ya que a esta temperatura se detiene el recambio proteico y todo el canal formado que se encontraba en retículo sube a membrana, aumentando el porcentaje de canales activos y por tanto la señal de la medida posterior²⁴⁸ Se comprobó que a 30°C, las células HEK no proliferaban, a diferencia de CHO, suponemos que debido a la especie de procedencia. Teniendo en cuenta esto y la confluencia final el día del experimento, la línea HEK pasaba de 37 a 30 °C a la confluencia final de 50-60%, mientras que la línea CHO debía pasarse como máximo a un 70-80% de confluencia para aumentar al 90-100% requerido para el ensayo.

- ❖ **Uso de Detachin™.** Para levantar las células antes del experimento, se comprobó que debía utilizarse Detachin™, >30 min a 37°C. Tanto el buen estado de la membrana como evitar los agregados de células son fundamentales para que se produzcan los sellos en células aisladas. Este producto que contiene una proteasa y su inhibidor, provoca la digestión de las proteínas de adhesión de las células con la superficie del frasco y de las células entre ellas, pero manteniendo la integridad de la membrana ya que la proteasa es inhibida en el momento que cumple su función. Como ventaja adicional, este producto hace que disminuyan los agregados celulares debido a la presencia de colagenasa.
- ❖ **Agitación pre-experimento de la suspensión de células.** Para evitar disgregar las células de forma mecánica por el paso por la punta de las pipetas, se mantenía a las células en agitación orbital, durante 2 horas a 150 rpm, a temperatura ambiente, y en un medio especial para crecimiento de células en suspensión, que contiene una alta concentración de glucosa y un pH ácido para compensar la falta de CO₂ fuera del incubador.
- ❖ **El número de células por pocillo en el experimento.** Se hicieron títulos de células y se comprobó que el número de células era fundamental debido al mecanismo propio del ensayo por el que las células quedan atrapadas por las micropipetas. Debe haber un flujo constante de células individuales que, en el momento en que las micropipetas

ejercen la succión, quedan atrapadas y mantenidas en *cell-attached*. Si en este momento algún agregado de células lo suficientemente grande choca con las células adheridas, las empujará, perdiéndose el sello. En el caso de CHO, células más pequeñas, redondas y que no forman agregados, se requería una densidad celular muy alta (entre $1-1.5 \times 10^6$ células/pocillo). Las células HEK, más grandes y con alta predisposición a formar clúster, requerían no superar las 800.000 células/pocillo.

❖ **Protocolo del ensayo.** Cómo se ha comentado, existían protocolos generales, en un principio, válidos para cualquier tipo de células ya que solo variaban según el tipo de canal y los tipos de registros deseados. El hecho de poseer dos líneas tan diferentes desveló que era necesario adaptarlos a cada una. Se hicieron modificaciones de los distintos subprotocolos, tanto de presión como de voltaje, hasta llegar a obtener resultados reproducibles.

➤ **HEKNav1.1wt**

- Modificado el protocolo de presión de *Break*: Dos pulsos de succión, de 10 y 15 inHg en vez de uno de 15, lo que favorece la entrada en *whole-cell* sin lisar la célula.
- Modificado el protocolo de presión de *Data acquisition*: Mantiene la succión a 5 inHg, en vez de bajar a 4 para prevenir que algún agregado de células arrastre las que están en *whole-cell*.
- Modificado el protocolo de voltaje de *Data acquisition*: Esto se varió igual para ambas líneas. Inicialmente los pulsos de voltaje, de -90, -120, -10, -90 mV, hacían perder el sello a lo largo del experimento, suponemos que porque se mantenía mucho tiempo a las células (>30 min de experimento) con cambios muy bruscos de voltaje. Se decidió que no era necesario llegar a -120 mV para asegurarnos de que el 100% de los canales estuviesen cerrados ya que no nos interesaba estudiar la cinética del canal. A -90 mV, en estado inactivo, los canales de sodio dan el mismo tipo de registros Además tras los resultados de las curvas I-V (mostrados más adelante en el punto 4 de resultados), y obtener a

que voltaje la intensidad es máxima, decidimos evitar subir el pulso a -10mV y fijarlo a -30mV para ambas líneas.

➤ CHONav1.6wt

- Modificado el protocolo de presión de *Break*: Un pulso de succión de 10 inHg en vez de uno de 15 inHg, ya que las células de la CHO son de menor tamaño y el exceso de vacío lisaba la célula.
- Modificado el protocolo de voltaje de *Data acquisition*: Explicado para HEKNav1.1wt.

Los parámetros a compensar, C_{slow} , P/N y R_{series} , fueron probados y modificados durante los primeros meses de la puesta a punto. Evidentemente dependían del experimento y debido a que nuestra prioridad era obtener la reproducibilidad de todos los ensayos dejaron de compensarse. Una vez establecido los protocolos finales y el método de análisis, se unificaron los registros sin el ajuste de estos parámetros.

3.2 Factor Z

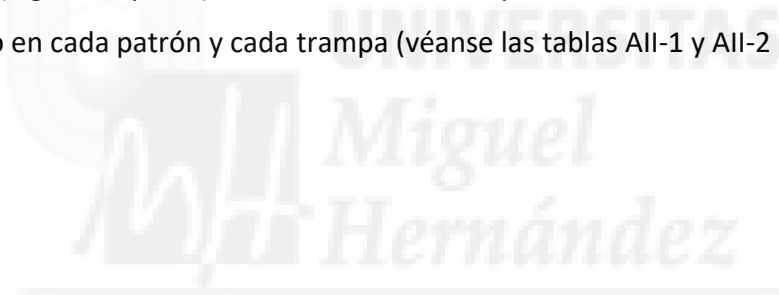
Se decidieron aprovechar los ensayos válidos en los que se hacían sellos estables y se obtenían corrientes aptas para ser analizadas, para hacer un estudio del factor Z. Este factor es una medida estadística del efecto del tamaño de la población, indispensable en los cribados de alto rendimiento. En esta tesis doctoral queríamos realizar un cribado masivo con una técnica nueva y aún no reproducible y la idea inicial era hacer un primer *screening* ($n_1=N_1$), probando cada compuesto únicamente una vez.

Se quiso evaluar si las diferencias entre la señal con la solución externa y con los posibles candidatos era suficiente como para ser medida, observada y cuantificada con este método de medid. Nuestras dudas se centraban en, si la selección de uno u otro barrido de corriente a lo largo de todo el tiempo de adición del compuesto podría influir, y si las diferencias entre patrones serían insalvables para el cribado ya que el número de células por trampa era impredecible, lo que generaba por tanto gran variabilidad intraensayo.

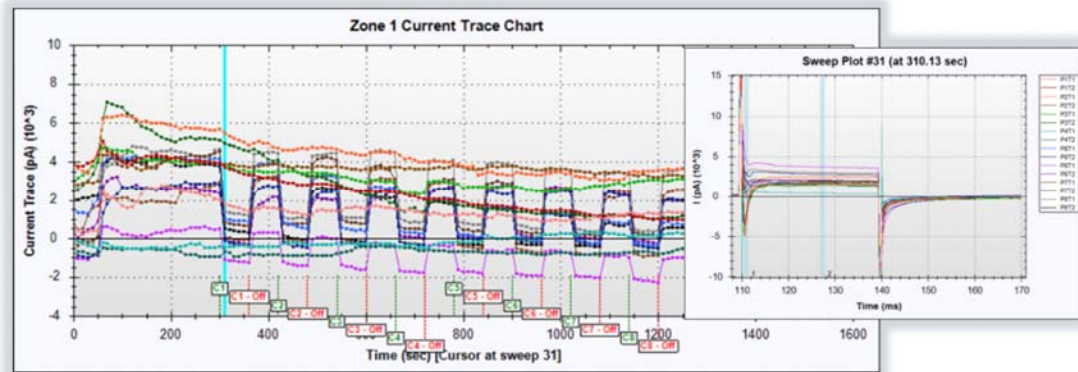
Debido a que no hay fármacos conocidos que actúen activando canales de sodio, se estudió únicamente el factor Z para antagonistas, con lidocaína 1mM como control de inhibición.

Cómo parte de la puesta a punto, durante estos ensayos, se dedujo que se debía fijar el compuesto 8 (C8) como buffer de lavado ya que, al no especificarlo, el lavado entre compuestos se realizaba con el mismo flujo de suspensión de células y era probable que muchas células ya en *whole-cell* se perdieran, sobre todo las HEKNav1.1wt, debido a que los agregados arrastraban las células fijadas.

Para cada línea celular, HEKNav1.1wt y CHONav1.6wt, los registros que sirvieron para el cálculo del factor Z, se realizaron sobre una única placa, 4 patrones con lidocaína 1mM y los otros 4 con solución externa. Los valores obtenidos, representados en la gráfica de incremento de corriente (Figs. 16A y 18A), con solución externa y con lidocaína 1mM, durante la adición de uno y otro en cada patrón y cada trampa (véanse las tablas AII-1 y AII-2 del ANEXO II).



A



B

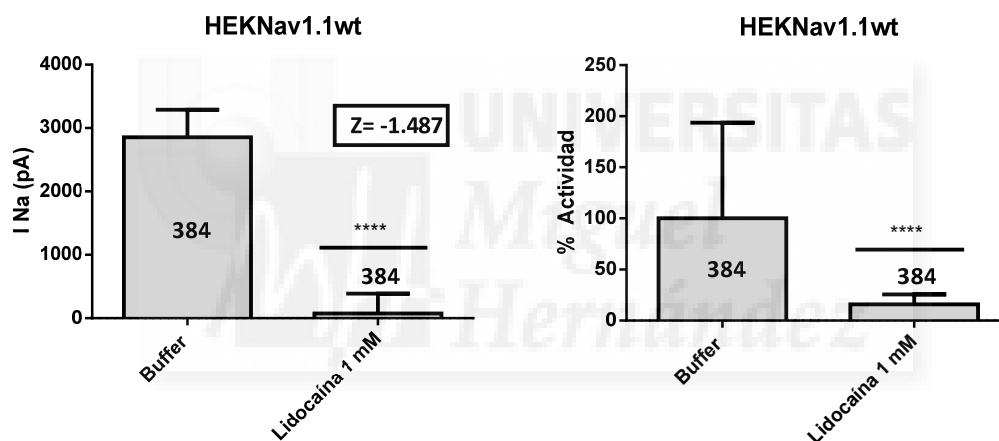


Figura 16. Factor Z para antagonistas con HEKNav1.1wt. A) Gráfica de incremento de corrientes (valores positivos) del canal cerrado (basal) menos canal abierto (pico) en el curso del experimento. Se observa claramente en las trampas en las que se adiciona lidocaína 1mM, que la corriente cae, y vuelve a subir en el lavado. B) La gráfica de columnas de la izquierda, representa los incrementos de corriente de sodio utilizados (Valores en la tabla AII-1 del Anexo II) para calcular el factor Z , como media \pm SD, mostrados en la tabla 10. En la gráfica de la derecha se normalizan los valores respecto al buffer como 100% de actividad del canal, y se representa como media \pm SD. En ambos casos se realizó un análisis estadístico mediante t de Student no pareado con la corrección de Welch en la que se asume que las SD no son iguales, siendo **** $P < 0,0001$ ($n_{buffer}=384$, $n_{lidocaína}=384$).

Se calculó el valor Z y se representaron los incrementos de corriente con sus desviaciones estándar utilizados para el cálculo de la ecuación, así como el % de actividad de los canales al normalizar los valores de los incrementos de corriente considerando el 100% la señal con *buffer* (Figs. 16B y 18B).

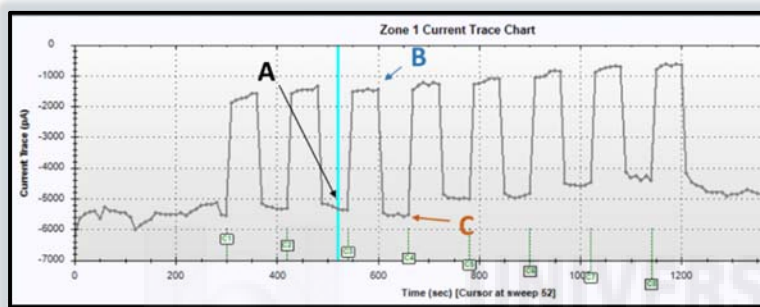
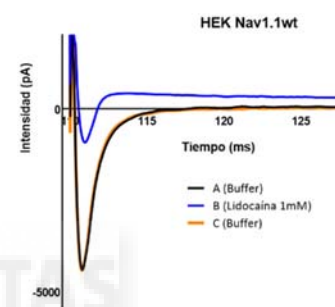
A**B**

Figura 17. Registros en el cálculo del factor Z con HEKNav1.1wt. A) Gráfica de incremento de corrientes (valores negativos) del canal abierto (pico) menos canal cerrado (basal) en el curso del experimento en una trampa de un patrón. Se muestran los puntos (A), (B) y (C) representados en la figura 6B. B) Registros de corriente obtenidos con buffer pre-lidocaína (A, negro), lidocaína (B, azul) y buffer post-lidocaína (C, naranja).

A



B

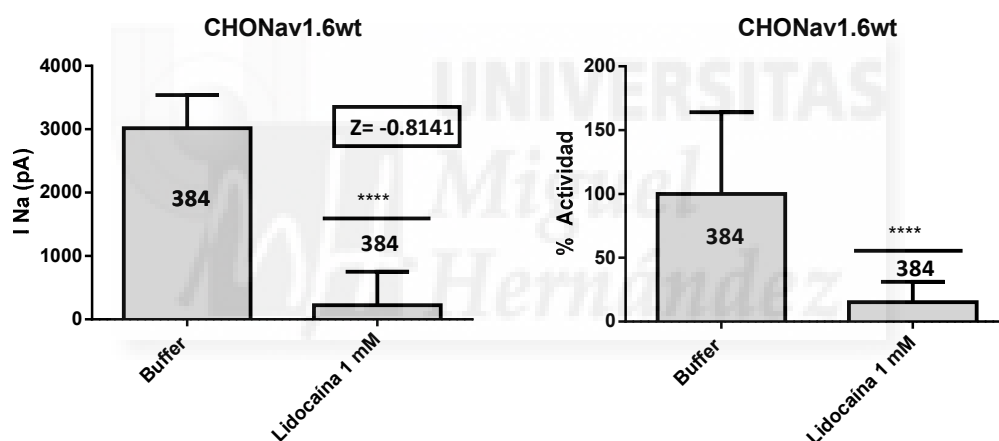


Figura 18. Factor Z para antagonistas con CHONav1.6wt. A) Gráfica de incremento de corrientes (valores positivos) del canal cerrado (basal) menos canal abierto (pico) en el curso del experimento. Se observa como en las trampas en las que se adiciona lidocaína 1mM, que la corriente cae, y vuelve a subir en el lavado. B) La gráfica de columnas de la izquierda, representa los incrementos de corriente de sodio (Valores en la tabla AII-2 del Anexo II) utilizados para calcular el valor Z, como media \pm SD, que se muestran en la tabla 10. En la gráfica de la derecha se normalizan los valores respecto al buffer como 100% de actividad del canal, y se representa como media \pm SD. En ambos casos se realizó un análisis estadístico mediante t de *Student* no pareado con la corrección de Welch en la que se asume que las SD no son iguales, siendo **** $P < 0,0001$ ($n_{buffer}=384$, $n_{lidocaína}= 384$)

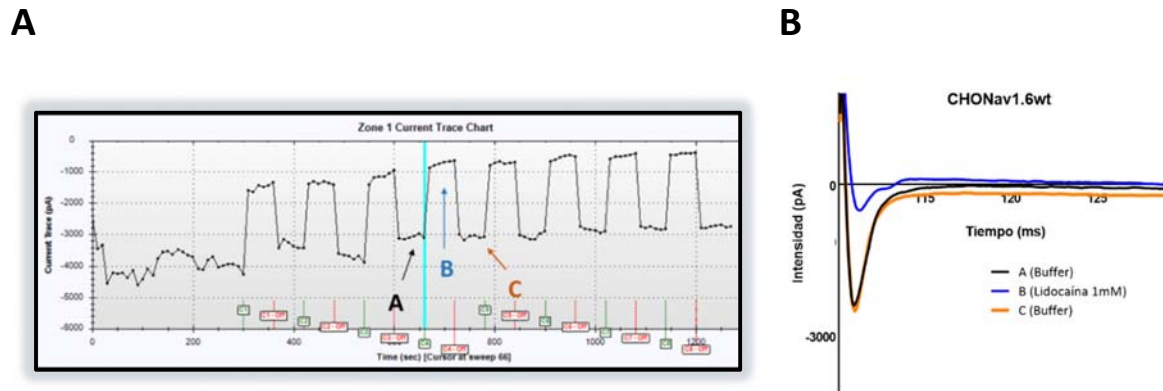


Figura 19. Registros en el cálculo del factor Z con CHONav1.6wt. **A)** Gráfica de incremento de corrientes del canal abierto (pico) menos canal cerrado (basal) en el curso del experimento. Se muestra una trampa de un patrón. Se muestran los puntos (A), (B) y (C) representados en la figura 7B. **B)** Registros de corriente obtenidos con buffer pre-lidocaína (A, negro), lidocaína (B, azul) y buffer post- lidocaína (C, naranja).

A pesar de que el factor Z para ambas líneas indicaría un ensayo no válido, al representar la actividad relativa se observa claramente como la lidocaína 1mM disminuye la corriente de los canales de sodio (Figs. 17B y 19B).

Además, debido a las características del equipo y del software, podemos hacer un seguimiento a tiempo real de todo el experimento (Figs. 17A y 19A). De esta forma se puede determinar en cada punto si hay decremento o aumento de corriente al aplicar un compuesto respecto al instante anterior en el que solo actuaba el buffer. Debido a lo expuesto se considera que los ensayos son válidos y que se podía proceder al cribado de las librerías.

Tabla 10. Factor Z para antagonistas con HEKNav1.1wt y CHONav1.6wt

Línea celular	Media _{Buffer} (pA)	SD _{Buffer} (pA)	n _{Buffer}	Media _{Lidocaína} (pA)	SD _{Lidocaína} (pA)	n _{Lidocaína}	Factor Z
HEKNav1.1wt	2856	2221	384	76	848	384	-1.487
CHONav1.6wt	3016	949	384	223	789	384	-0.8141

3.3 Controles

Una vez obtenidos sellos estables y células en *whole-cell* durante la mayor parte del experimento, se comenzaron los ensayos de efectividad de los controles seleccionados y la caracterización electrofisiológica de las líneas celulares.

Simultáneamente, se llevaron a cabo pruebas preliminares del cribado de la librería de compuestos NIHCC seleccionada para esta tesis doctoral. Para este pre-cribado nos basamos en los resultados obtenidos con los ensayos de FLPR[®] mostrados en el apartado 2 de resultados. Se testó TTX 100 nM, veratridina 100 μ M y lidocaína 100 μ M para ambas líneas y ATX-II 500 nM en HEKNav1.1wt y ATX-II 2 μ M en CHONav1.6. Todos los activos de la librería se probaron a 100 μ M (1%DMSO). Esto ayudó a seguir ajustando los parámetros y a seleccionar el método de medida final.

La idea era encontrar una forma de análisis que permitiera ver simultáneamente activación e inhibición de corriente, que era el objetivo de esta tesis doctoral. Inicialmente se representaron los incrementos de corriente que nos daba el software en los diferentes eventos de adición de compuestos, pero al representar estos valores normalizando entre 100% de actividad con buffer y 0% de actividad con TTX 100 nM, obteníamos un gráfico de columnas donde ambos canales mostraban menos actividad con los controles positivos de activación que en presencia de buffer (Fig. 20).

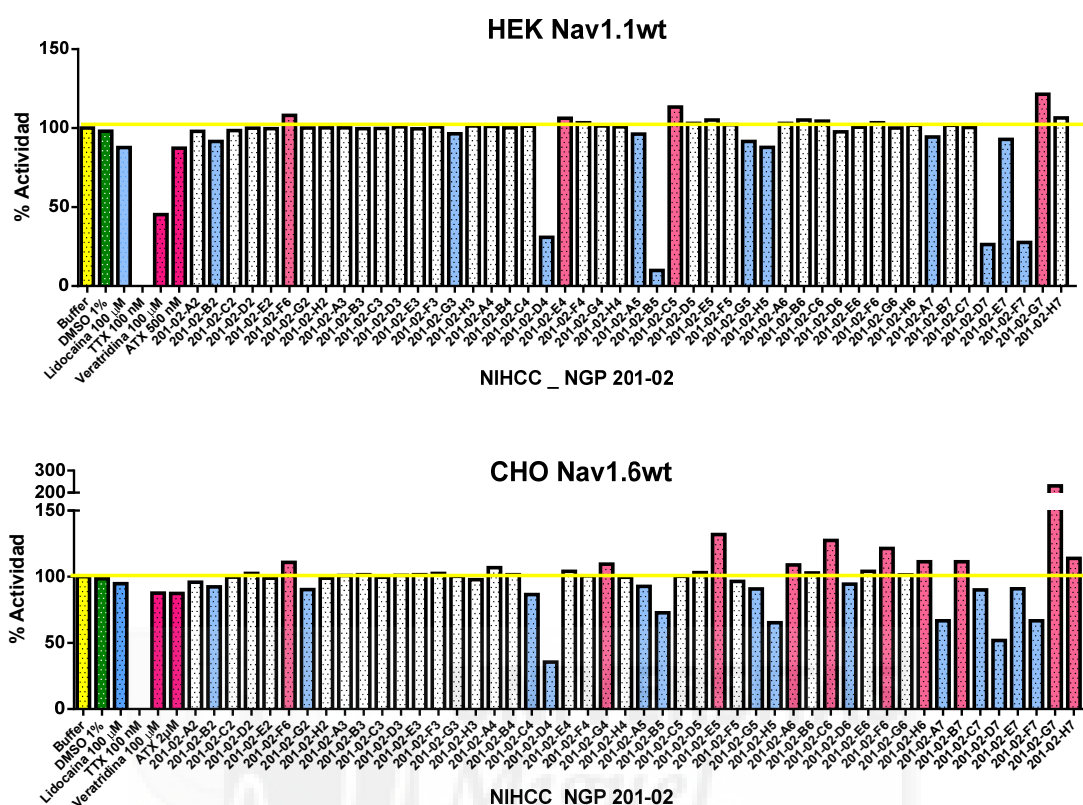


Figura 20. Gráficas preliminares de la subserie NGP 201-02 en HEKNav1.1wt y CHONav1.6wt. En las gráficas se representa la actividad de los canales con los incrementos de corriente exportados, normalizando entre 100% de actividad la obtenida con el buffer (línea en amarillo) y el 0% con TTX 100nM (sin columna). Este análisis nos mostró que los dos controles positivos de activación, veratridina y ATX-II, no actuaban aumentando el pico de corriente y por tanto este método no era útil para discernir de forma rápida entre activadores e inhibidores. Los compuestos de la librería se probaron a 100 μ M y 1% DMSO. Tal y como se observa, a esta concentración (verde), el vehículo no afectaba a la corriente basal.

Esto también llevó a plantear la idea de qué si queríamos ver que sucedía realmente con el DMSO (1%), vehículo de todas las moléculas de la librería, debía probarse de forma continuada en todos los pocillos de compuestos, ya que eso es lo que sucedería realmente durante el cribado. Se comprobó que el DMSO a esta concentración provocaba unas oscilaciones en los registros de la corriente de sodio a través de los canales que eran similares a los que se producían únicamente con el buffer, suponemos que por el impulso del flujo en el momento de adición del compuesto (Fig. 21).

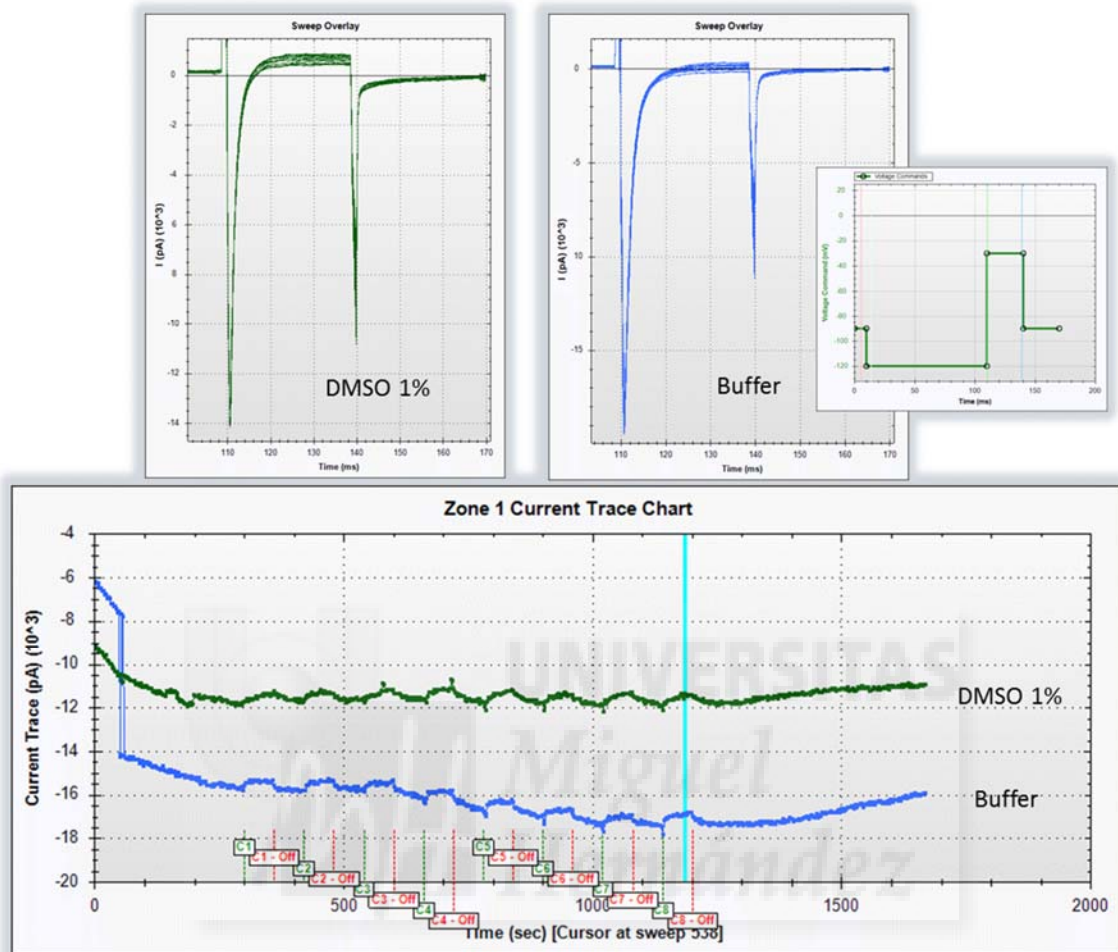


Figura 21. Efecto de DMSO 1% durante el curso del experimento para HEKNav1.1wt. Parte superior, registros solapados con DMSO1% y solo buffer, a lo largo del experimento. Parte inferior, gráfica de incremento de corrientes (valores negativos) del canal abierto (pico) menos canal cerrado (basal) en el curso del experimento. Se observa pulsos en el momento de adición de los compuestos, tanto para el DMSO 1% como para el buffer.

Se decidió estudiar también que sucedía con cada control y que tipo de registros se veían. Se mostrarán figuras de los registros obtenidos intensidad vs. tiempo y las gráficas de incremento de intensidad para todos los controles, únicamente para uno de los dos canales ya que los registros eran similares para ambas líneas celulares.

Los controles positivos de inhibición seleccionados, lidocaína (Fig. 22) y TTX (Fig. 23), eran fácilmente interpretables tanto en la gráfica de ΔI vs. tiempo del software, como en la gráfica de columnas de porcentaje de actividad. El bloqueo en la entrada de sodio se ve reflejado como un decremento en la longitud del pico de corriente por tanto el incremento de intensidad disminuye.

Para el caso de los controles positivos de activación, comprobamos que el valor del incremento de corriente caía debido a que no se ve aumentada la longitud del pico de intensidad máxima. La veratridina despolariza la membrana provocando la apertura temprana de los canales de sodio y cuando se efectúa el registro de corriente simultáneo al pulso de voltaje diseñado, el canal ya se ha cerrado (Fig. 24). Para el caso de la ATX-II, tampoco nos servía representar el incremento del pico de corriente, ya que esta neurotoxina actúa retrasando el cierre del canal por lo que únicamente se observa un aumento de la apertura de la curva de inactivación (Fig. 25). En este caso la actividad del canal no se veía modificada respecto al buffer control. Las mismas observaciones se podían asignar a la gráfica ofrecida por el software en la que se representan incrementos de corriente frente al tiempo de ejecución del experimento.

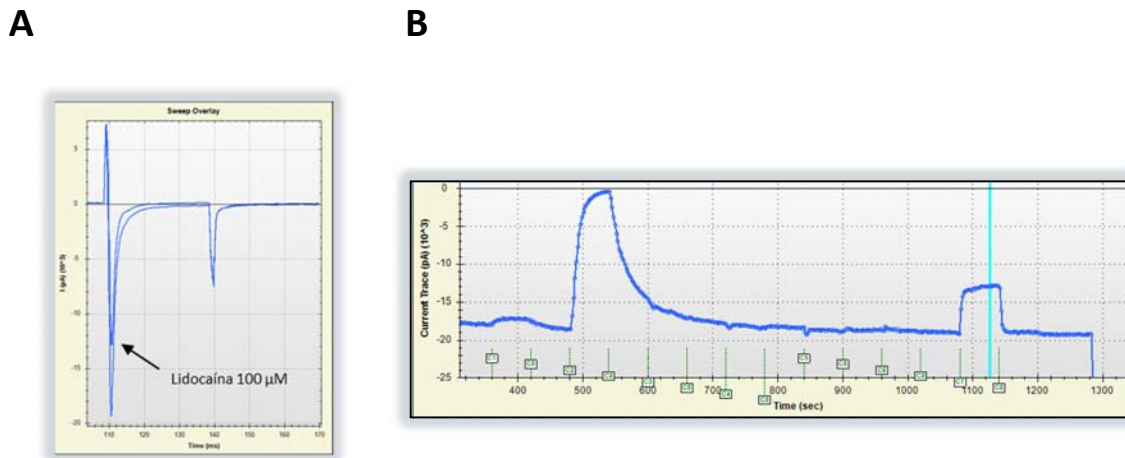


Figura 22. Efecto de la lidocaína sobre los canales Nav. A) Registros de corriente solapados de los barridos con solución externa inmediatamente antes de añadir la lidocaína. B) Gráfica de incremento de corrientes del canal abierto (pico) menos canal cerrado (basal) en el curso del experimento. La línea vertical (cursor) en azul claro, en el compuesto 7, marca el momento de adición de lidocaína 100 μM , reflejado en la gráfica A en el pico menor. En el compuesto 2 (C2) se aprecia la presencia de un bloqueador muy potente

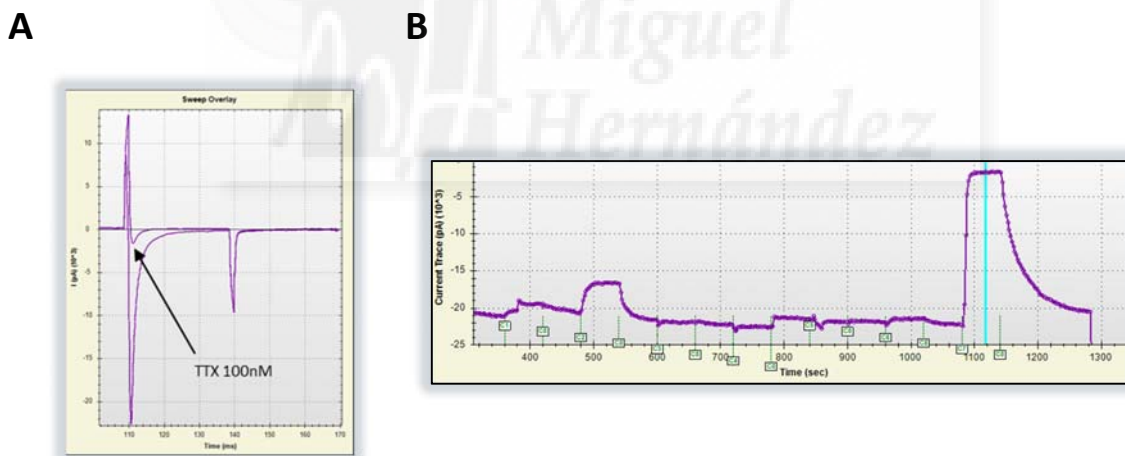


Figura 23. Efecto de la TTX sobre los canales Nav a estudio. A) Registros de corriente solapados de los barridos con solución externa inmediatamente antes de añadir la TTX. B) Gráfica de incremento de corrientes del canal abierto (pico) menos canal cerrado (basal) en el curso del experimento. El cursor azul en el compuesto 7 (C7), marca el momento de adición de TTX 100 nM, reflejado en la gráfica A en el pico casi nulo. En el compuesto 2 (C2), se aprecia la presencia de un bloqueador suave.

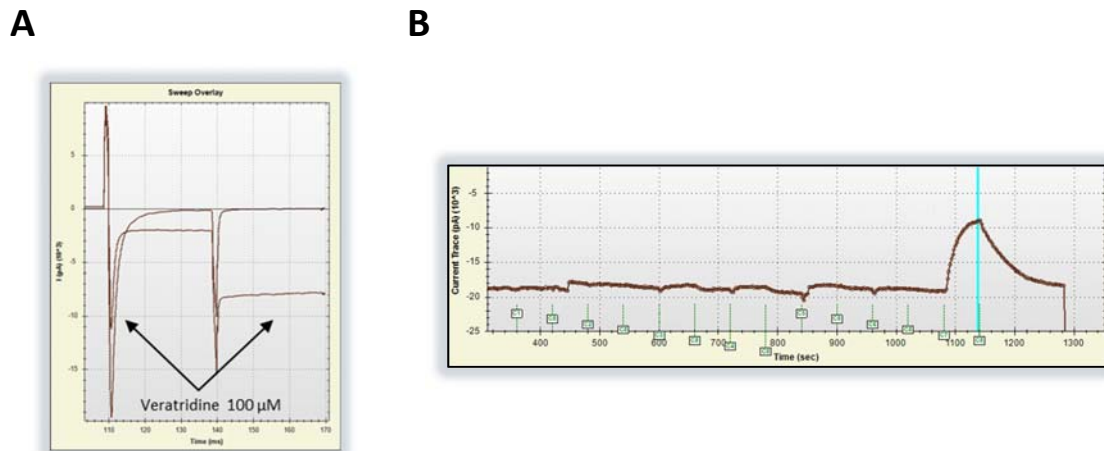


Figura 24. Efecto de la veratridina sobre los canales Nav. **A)** Registros de corriente solapados de los barridos con solución externa inmediatamente antes de añadir la veratridina. **B)** Gráfica de incremento de corrientes del canal abierto (pico) menos canal cerrado (basal) en el curso del experimento. El cursor azul en el compuesto 7 (C7), marca el momento final de la adición de veratridina 100 μ M, reflejado en la gráfica **A** en un menor pico y una basal desplazada, igual que sucedía con ATX, lo que indica la gráfica de incrementos es una pérdida de corriente cuando en realidad aumenta la corriente persistente y la corriente de cola, registro típico con veratridina.

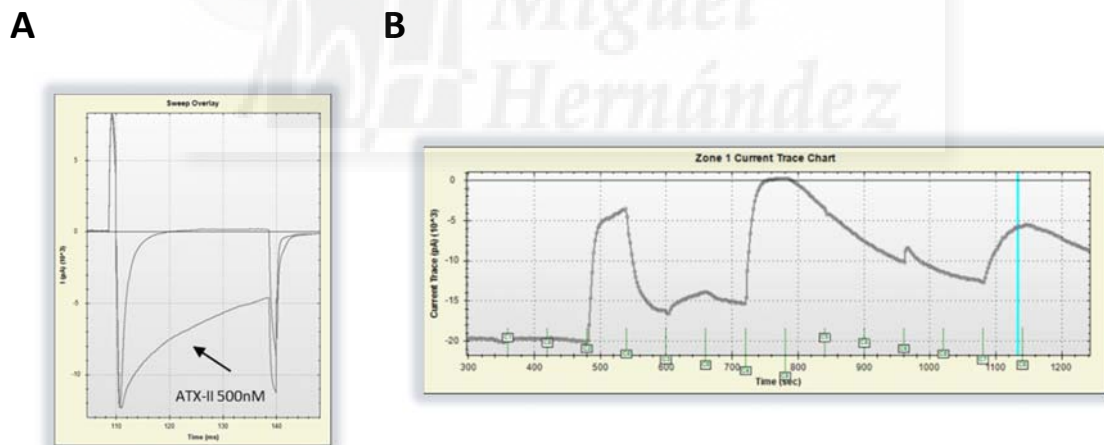


Figura 25. Efecto de la ATX-II sobre los canales Nav. **A)** Registros de corriente solapados de los barridos con solución externa inmediatamente antes de añadir la ATX. **B)** Gráfica de incremento de corrientes del canal abierto (pico) menos canal cerrado (basal) en el curso del experimento. El cursor azul en el compuesto 7 (C7), marca el momento de adición de ATX 500 nM, reflejado en la gráfica **A** en la curva abierta. Lo que indica la gráfica de incrementos es una pérdida de corriente cuando en realidad la corriente aumenta por inactivación del cierre. En el compuesto 2 (C2) y 3 (C3) se intuiría la presencia de bloqueadores y en 4 (C4), un bloqueador quasipermanente que impide la recuperación del canal con los lavados

3.4 Método de análisis

Poniendo en conjunto todo lo que se había visto durante la puesta a punto:

- Las medidas de corriente o incrementos de corriente eran un sumatorio de las corrientes individuales de las células en *whole-cell* en cada trampa, no la media aritmética.
- El número de células en *whole-cell* depende del estado de la membrana celular.
- Debido a la longitud del experimento es probable que se pierda corriente a lo largo del tiempo, posiblemente porque haya células que sufran lisis o se vean arrastradas si el sello no es fuerte.
- No hay fármacos que actúen únicamente aumentando la actividad del canal, y las toxinas conocidas, no incrementan el pico de corriente, sino que aumentan la probabilidad de apertura del canal o inactivan el cierre.

Así, era necesario un método de análisis que tuviera en cuenta toda la curva del registro, y que lo relativice al momento previo de adición de buffer respecto al compuesto. Por este motivo, se decidió utilizar el área bajo la curva como señal de intensidad de corriente con compuesto, respecto a la señal con buffer. El área bajo la curva se calculó como el sumatorio de cada valor de corriente con el tiempo, desde que comienza el pico, hasta el final del pulso de voltaje (para incluir los posibles activadores que actúen como la veratridina) sin tener en cuenta las corrientes transitorias. A esto lo llamamos **Actividad Relativa del canal**.

$$\frac{\text{Señal compuesto}}{\text{Señal Buffer}} = 1$$

Sin efecto

Ecuación 10

$$\frac{\text{Señal compuesto}}{\text{Señal Buffer}} > 1$$

Activador de canal de sodio

Ecuación 11

$$\frac{\text{Señal compuesto}}{\text{Señal Buffer}} < 1$$

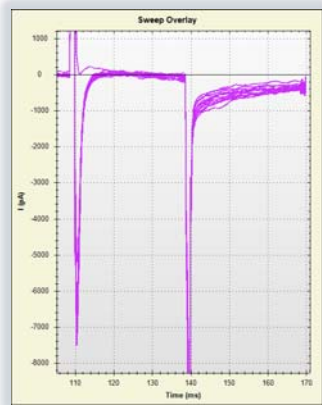
Bloqueador de canal de sodio

Ecuación 12

Al obtener la actividad relativa, se comprobó que la TTX 100 nM a pesar de bloquear el canal y hacer desaparecer el pico, ofrecía algo de corriente de cola residual y la actividad relativa nunca era cero (Fig. 26). Así, para obviar esta corriente residual, se normalizó la actividad relativa entre 100% que era la actividad en presencia de la solución externa y 0% la señal con TTX 100 nM. A esto lo llamamos **Porcentaje de la Actividad Relativa del Canal**.

Con estos parámetros, representamos de nuevo las medidas obtenidas con solución externa y con DMSO 1% aplicado de forma continuada en las 7 posiciones de un único patrón (C1-C7). Se graficaron también la actividad en presencia de los controles, probados en diferentes placas (Fig. 27). Los valores de la actividad en presencia de buffer y de TTX se utilizaron, en el resto de los experimentos para la obtención del porcentaje de actividad de los canales. veratridina 100 µM y lidocaína 100 µM. sirvieron de controles positivos de activación e inhibición.

A



B



C

	A2	B2	C2	D2	E2	F2	TTX
C/Buffer	1.00545	0.74025	0.88803	1.00641	0.94393	1.01056	0.61590

$$\frac{\text{Señal compuesto}}{\text{Señal buffer}} = 1$$

$$\frac{\text{Señal compuesto}}{\text{Señal buffer}} > 1$$

$$\frac{\text{Señal compuesto}}{\text{Señal buffer}} < 1$$

Figura 26. Efecto de la TTX sobre un canal de sodio y corriente residual. A) Registros de corriente de HEKNav1.1wt con solución externa con pico máximo y TTX corriente anulada (cursor en B) B) Curso del experimento y efecto de la TTX bajo el cursor azul. C) Actividad del canal con cada compuesto relativo a la que presentaba con solución externa en el pulso de voltaje inmediato anterior al evento. Se aprecia como TTX presenta un valor residual a pesar de bloquear completamente el canal.

Se comprueba que, con este método de análisis, se consigue simultáneamente y de forma rápida, discernir entre los controles positivos de activación y de inhibición, en ambas líneas celulares, facilitando la búsqueda de los candidatos que aumenten la función de Nav1.1 y el bloqueo de Nav1.6.

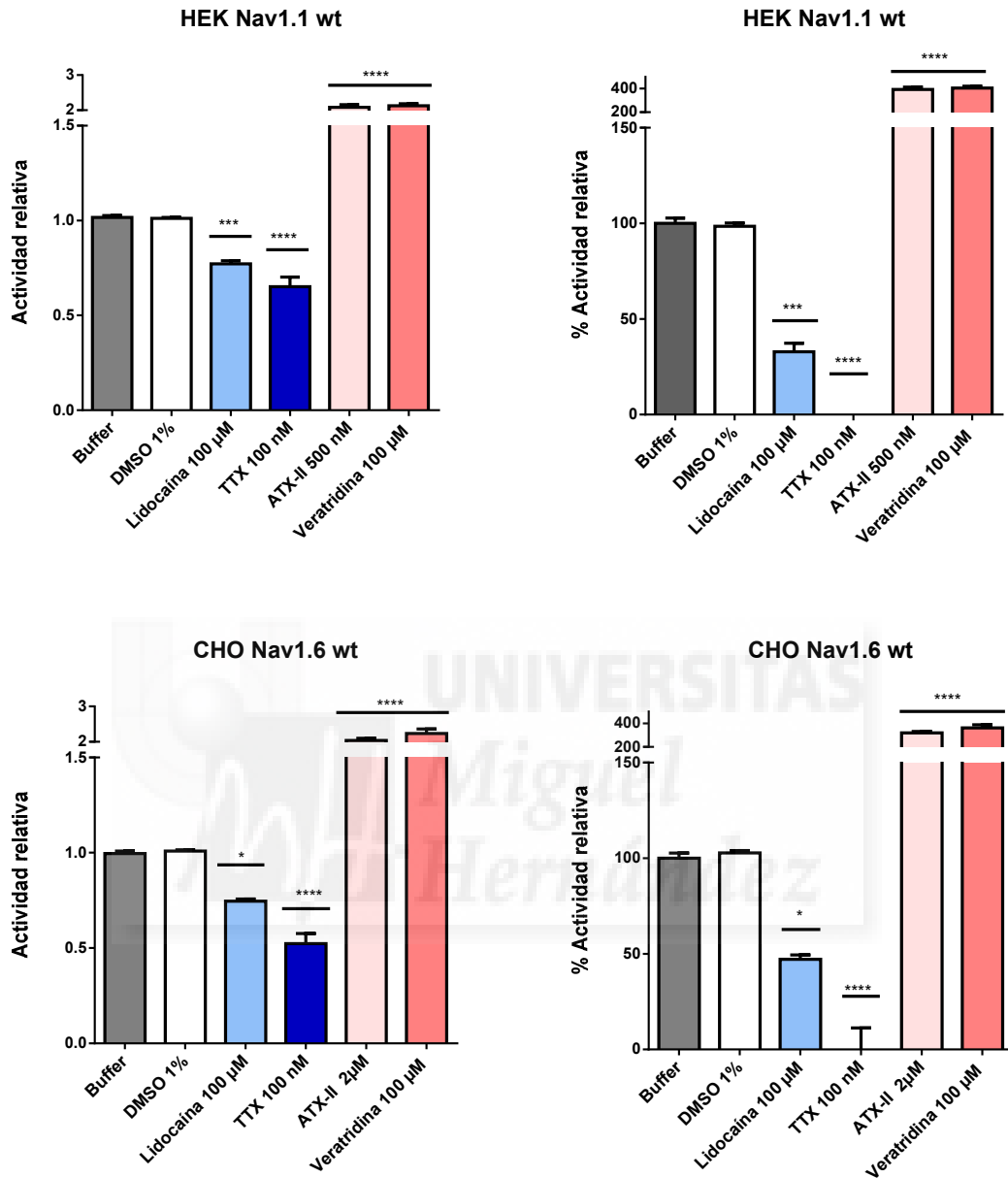


Figura 27. Efecto de los controles con el nuevo tratamiento de datos. Las gráficas de columnas de la izquierda, representan la actividad relativa de los canales con el compuesto respecto del buffer. En la gráfica de la derecha se normalizan los valores respecto al buffer como 100% de actividad del canal y 0% con TTX 100 nM. Todos los valores se representan como media ± SEM y se realizó un análisis simple de varianzas, ANOVA seguido de un test de comparación múltiple de Dunnett de cada columna con la actividad en presencia únicamente de buffer, siendo **** P < 0,0001 (n≥5).

4 CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS LÍNEAS CELULARES

4.1 Estudio electrofisiológico de las líneas celulares

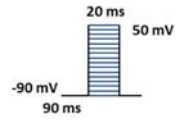
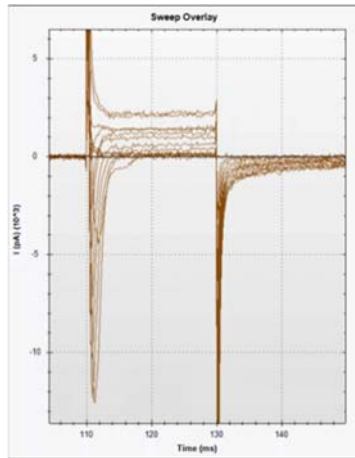
Se quiso comprobar que, con nuestra metodología aplicada al Ionflux™, era posible hacer una caracterización electrofisiológica de los canales de los canales Nav1.1 y Nav1.6 en las líneas heterólogas.

De la línea CHONav1.6wt, cedida por UCB Pharma, conocemos los parámetros biofísicos que nos indicaron a su llegada. UCB Pharma realizó el estudio mediante *patch-clamp* utilizando otra plataforma automática llamada Patchliner (Nanion, Munich). Compararemos, en nuestras condiciones de cultivo, el voltaje umbral de activación, el voltaje de intensidad máxima, y las curvas de activación e inactivación del estado estacionario. Como se indicó en el apartado 1 de materiales y métodos sobre las líneas celulares utilizadas, no es posible remitir referencia bibliográfica acerca de las características de esta línea en concreto, ya que fue una comunicación personal.

En el caso de HEKNav1.1wt, la línea había sido utilizada para el estudio de diferentes neurotoxinas, aunque no se aporta mucha información sobre sus parámetros electrofisiológicos¹⁹⁵.

Se realizaron medidas de corriente utilizando el equipo Ionflux™, para obtener algunos parámetros biofísicos (Fig. 32 y Tabla 11), tanto en las líneas celulares que expresaban los canales como en las líneas huésped, HEK y CHO vacías, para comprobar si presentaban corrientes de sodio endógenas. Los registros con la línea HEK resultaron, como esperábamos, en líneas basales de corriente cero, pero con células CHO se obtenían corrientes de sodio, aptas para ser medidas (Figs. 28-31).

A



B

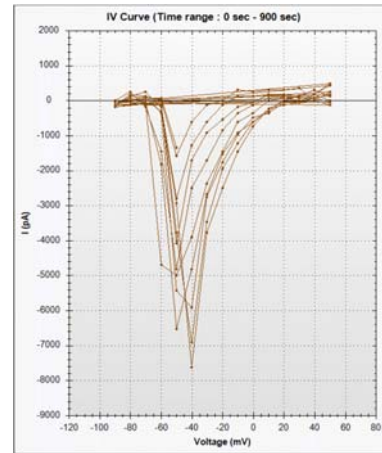
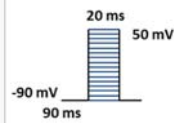
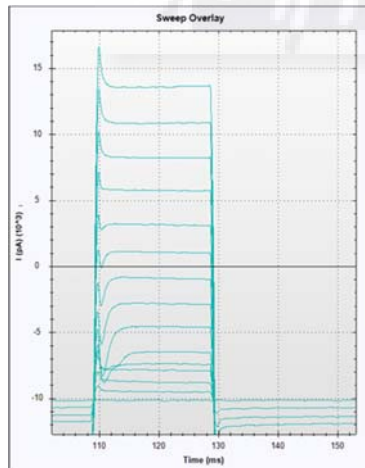


Figura 28. Registros y curva IV de HEKNav1.1wt. A) Registros de la corriente de sodio a distintos voltajes previa indicación de ajustar a línea basal. B) Curva IV obtenida del software con el pico máximo de corriente a -40mV. Estos registros se hicieron con la última versión del software que permitía ajustar la línea basal.

A



B

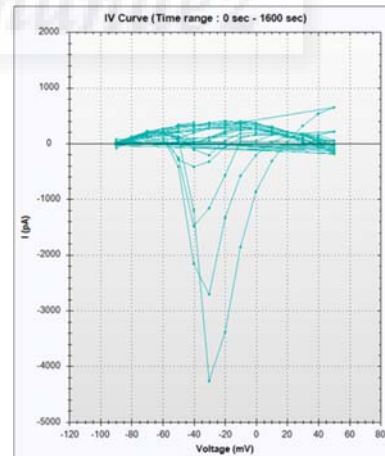
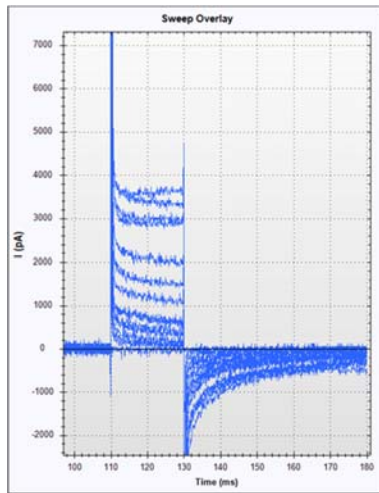


Figura 29. Registros y curva IV de CHONa1.6wt. A) Registros de la corriente de sodio a distintos voltajes sin ajustar a línea basal. B) Curva IV obtenida del software con el pico máximo de corriente a -30 mV.

RESULTADOS

A



B

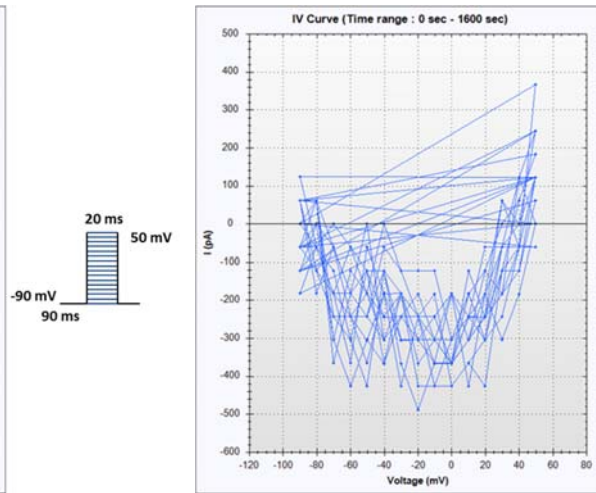
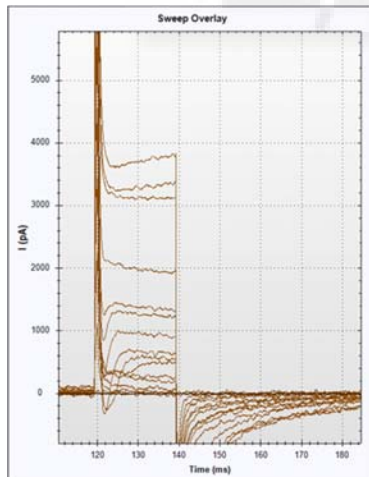


Figura 30. Registros y curva IV de HEK. A) Registro sin picos de corriente en células HEK. B) Curva IV obtenida del software, sin pico máximo de corriente de entrada.

A



B

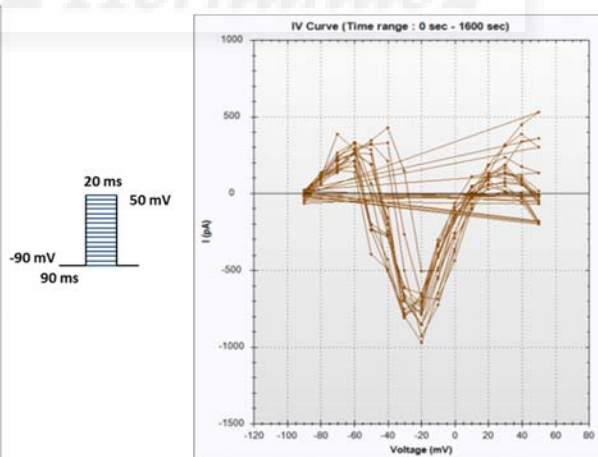


Figura 31. Registros y curva IV de CHO. A) Registros de la corriente de sodio a distintos voltajes. B) Curva IV obtenida del software, en este caso el registro muestra el pico máximo en -20 mV

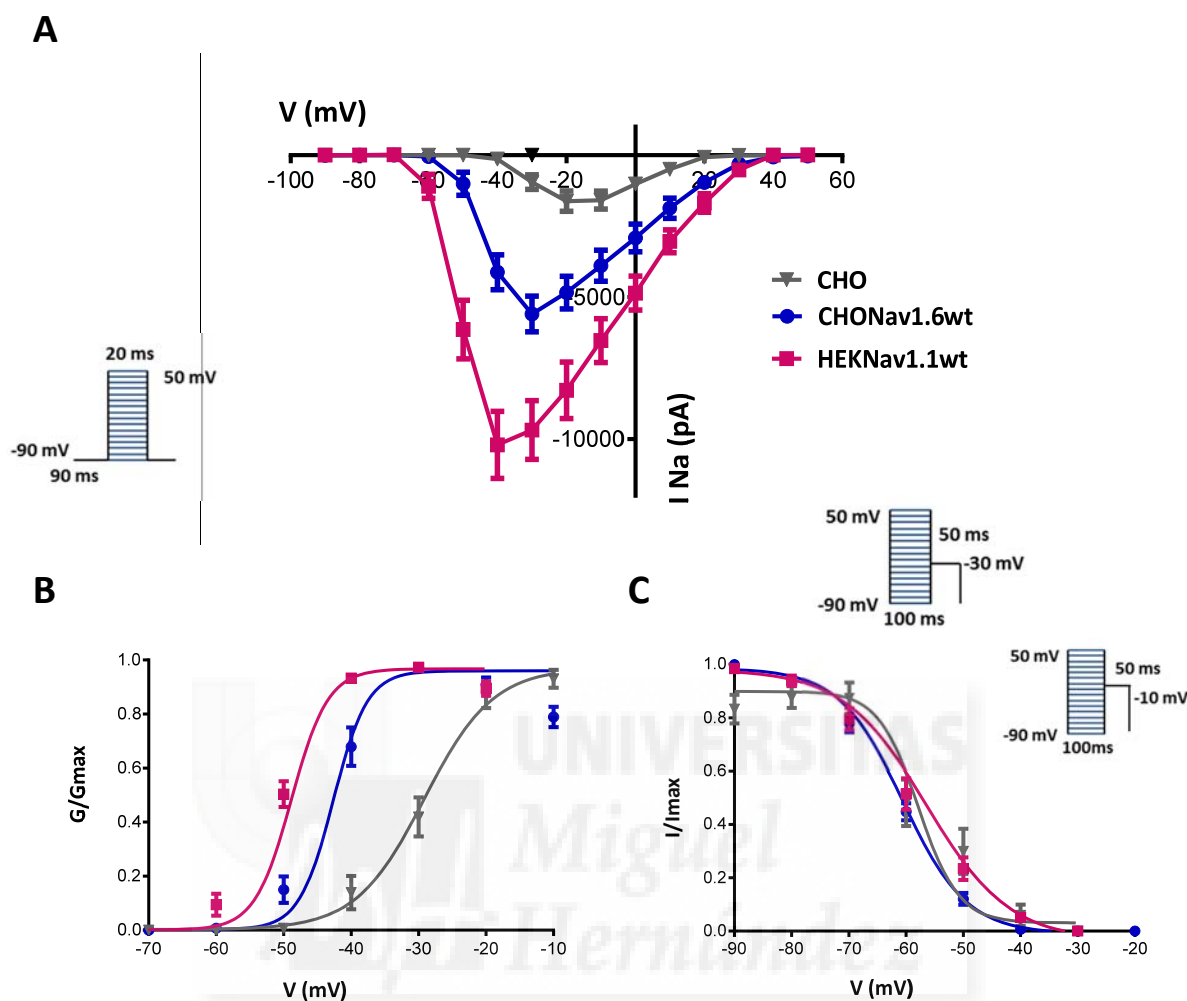


Figura 32. Propiedades biofísicas de las líneas celulares CHO, CHONav1.6wt y HEKNav1.1wt. A) Curvas I-V para las 3 líneas celulares. Potencial a -90 mV durante 90 ms y medidas durante 20 ms en pulso de +10 mV desde -90 mV hasta + 50 mV **B)** Curvas de activación voltaje-dependiente, con la conductancia normalizada ajustada a la ecuación de Boltzmann. Los valores $V_{0.5}$ y el factor de la pendiente K se muestran en la tabla 11. **C)** Curvas de inactivación rápida voltaje-dependiente, a -30 mV para las líneas heterólogas y -10 mV para CHO, aplicando prepulsos de voltaje de +10 mV desde -90 mV a +50 mV durante 100 ms ajustando a la ecuación de Boltzmann. Los valores $V_{0.5}$ y el factor de la pendiente K se muestran en la tabla 11. Todas las gráficas se han representado como media \pm SEM para ntotal=12; N \geq 3.

Habitualmente cuando se representa la curva I-V, se normaliza la intensidad de la corriente con la capacitancia media de las células, representando densidad de corriente. En este caso, ese cálculo es imposible puesto que, como se comentó en la sección de puesta a punto, el número de células que entran en *whole-cell* en una trampa concreta es desconocido

RESULTADOS

y el equipo da el sumatorio de todas las corrientes registradas, no la media aritmética. Es decir, el pico de corriente máximo obtenido no es un valor que caracterice a la línea celular, ya que depende del experimento, aunque si lo será el voltaje al cual la intensidad de corriente es máxima.

Tabla 11. Parámetros biofísicos de las corrientes de sodio de las líneas celulares

Línea celular	V _{umbral} (mV)	V _{max} (mV)	I _{max} (pA)	V _{0.5} activación (mV)	K activación	V _{0.5} inactivación (mV)	K inactivación
CHO	-40	-10	-1618.67 ± 355.84	-29.14 ± 0.96	5.06 ± 0.86	-57.87 ± 0.94	-3.56 ± 0.93
CHONav1.6wt	-60	-30	-5590.00 ± 627.03	-42.63 ± 0.29	2.52 ± 0.21	-60.58 ± 0.26	-5.60 ± 0.23
HEKNav1.1wt	-70	-40	-10203.58 ± 1180.02	-48.84 ± 0.21	2.70 ± 0.27	-56.48 ± 0.79	-7.30 ± 0.75

Habitualmente cuando se representa la curva I-V, se normaliza la intensidad de la corriente con la capacitancia media de las células, representando densidad de corriente. En este caso, ese cálculo es imposible puesto que, como se comentó en la sección de puesta a punto, el número de células que entran en *whole-cell* en una trampa concreta es desconocido y el equipo da el sumatorio de todas las corrientes registradas, no la media aritmética. Es decir, el pico de corriente máximo obtenido no es un valor que caracterice a la línea celular, ya que depende del experimento, aunque si lo será el voltaje al cual la intensidad de corriente es máxima.

No es posible comparar la línea HEKNav1.1wt con bibliografía propia ya que no se ha publicado.

Estudios biométricos de Nav1.1 revelan que los valores dependen en gran medida de la línea en la cual se expresa el canal, de si la expresión es estable o transitoria, y si se coexpresa con las subunidades auxiliares o no. El hecho de que se haya demostrado la presencia en células HEK de una subunidad βA endógena, da idea de la variabilidad de ciertos parámetros según el contexto de la medida.

Así, se encuentran, por ejemplo, potenciales del pico de corriente entre -30 y 0 mV , con parámetros de activación de $V_{0.5}$ -40 a 20 mV y K de 7 y unas constantes de inactivación del estado estacionario de $V_{0.5}$ alrededor de -65 mV y K de 5-7 ^{191, 249-252}.

En el caso de CHONav1.6wt, podemos comparar con los parámetros indicados al recibir la línea celular y se resume en la tabla 12.

Tabla 12. Comparativa de los parámetros funcionales de CHONav1.6wt

Línea celular	V_{umbral} (mV)	V_{max} (mV)	$V_{0.5}$ activación (mV)	K activación	$V_{0.5}$ inactivación (mV)	K inactivación
CHONav1.6wt (Nanion)	-60	-10	-27.8 ± 2.3	6.2 ± 0.3	-56.2 ± 1.8	-4.8 ± 0.3
CHONav1.6wt (Ionflux)	-60	-30	-42.63 ± 0.29	2.52 ± 0.21	-60.58 ± 0.26	-5.60 ± 0.23

Estudiando estos valores, donde más diferencia encontramos es en voltaje al que la corriente es máxima y por relación los parámetros de la curva de activación, en nuestros datos, desplazado a valores más negativos. El resto de los parámetros guardan similitud.

Si comparamos con otros estudios, este canal suele expresarse heterológicamente en la línea ND7/23, una línea proveniente de un hibridoma de rata/ratón, que aporta al canal un contexto prácticamente nativo. Así se encuentran picos máximos de -10 a 0 mV, constantes de activación entre -17 y -30 mV y K de 6, y de inactivación rápida de -65 mV y K de 5 ²⁵³⁻²⁵⁵.

Las corrientes endógenas de sodio de la línea CHO huésped, aunque presenten un voltaje umbral y un pico máximo a valores más positivos, podrían influir en la actividad registrada del canal Nav1.6. Este dato debe tenerse en cuenta ante una posible selección de modificadores de canales de sodio estudiados en esta línea CHONav1.6wt.

4.2 Estudio farmacológico de las líneas celulares

Las 10 isoformas de los canales de sodio dependientes de voltaje se pueden clasificar según su sensibilidad a TTX. Tanto el canal Nav1.1 como el Nav1.6, están incluidos en el grupo de los sensibles a TTX, lo que implica que las IC_{50} se encuentran en el orden de nanomolar. Para corroborar esto con las líneas HEKNav1.1wt y CHONav1.6wt, se realizaron ensayos en dosis respuesta de TTX, sabiendo por el estudio en la puesta a punto que a 100 nM la inhibición de la corriente era completa.

Se probaron 7 concentraciones en un solo patrón, con 60 segundos de adición de compuesto más 120 segundos de lavado con buffer (Figs. 33 y 34). En algún experimento, la recuperación del canal no era completa con los 120 segundos de buffer, pero aumentar el tiempo de lavado alargaba el experimento y se incrementaba la posibilidad de perder el sello. Se consideró y probó la posibilidad de dividir la dosis respuesta en varios patrones para poder alargar el tiempo de lavado, pero finalmente se decidió hacer la curva completa en el mismo patrón y en el caso de que el canal no se recuperara completamente entre las concentraciones más elevadas, tomar como valor del buffer el de la línea basal anterior a la pérdida de corriente por TTX.

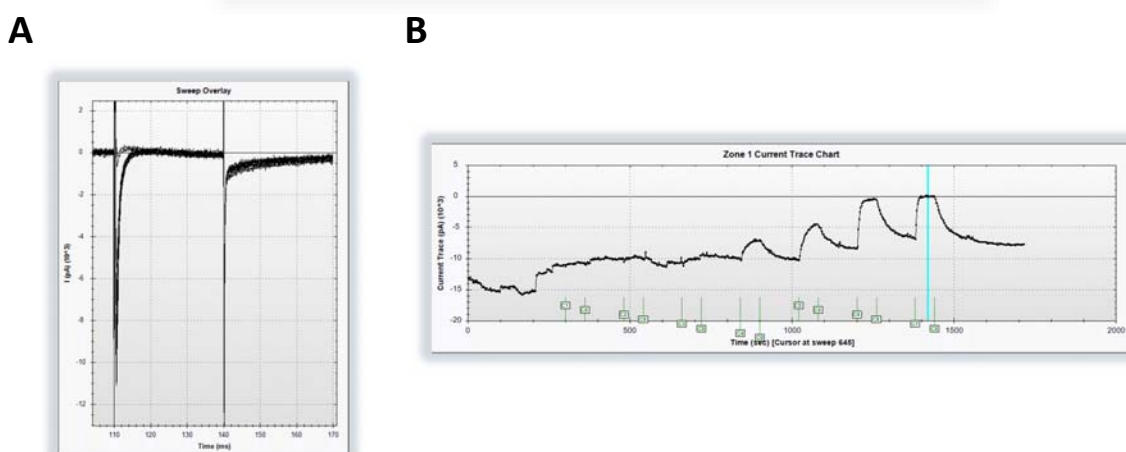


Figura 33. Dosis respuesta de TTX sobre HEKNav1.1wt. A) Registros solapados de los barridos con solución externa inmediatamente antes de añadir cada dosis de TTX. **B)** Dosis respuesta completa. Se observa que el canal no recupera completamente la actividad a las concentraciones más altas, siendo además su efecto de inhibición completa.

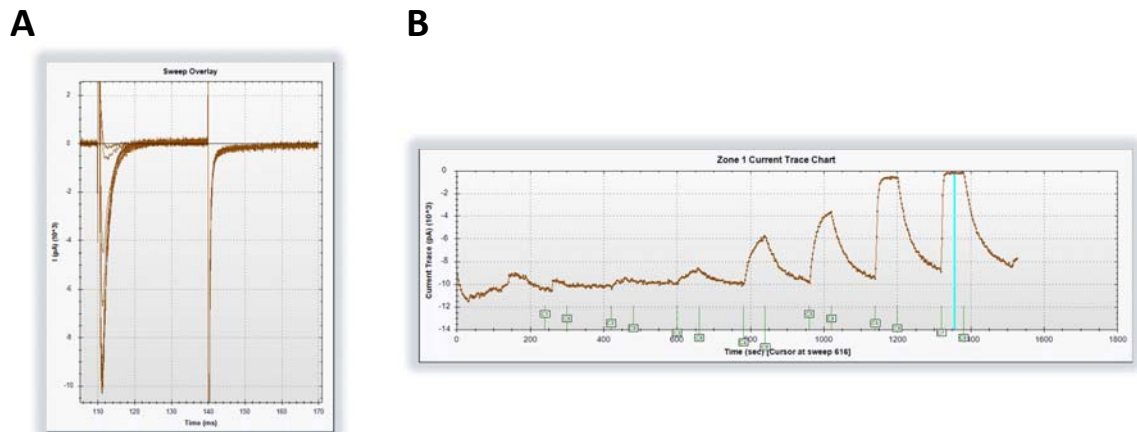


Figura 34. Dosis respuesta de TTX sobre CHONav1.6wt. A) Registros solapados de los barridos con solución externa inmediatamente antes de añadir cada dosis de TTX. B) Dosis respuesta completa de TTX de menor a mayor concentración. A 50 nM (C6) y 100 nM (C7), el efecto sobre el canal es de inhibición completa.

Se representaron los valores en gráfica de columnas, utilizando para la normalización entre 0-100% el valor del buffer y la TTX 100 nM utilizados en el estudio de los controles (Fig. 35) Ajustando los valores de la dosis respuesta a una ecuación de Hill obtenemos los valores de la IC_{50} y el Factor de cooperatividad de Hill (Fig. 36 y Tabla 13)

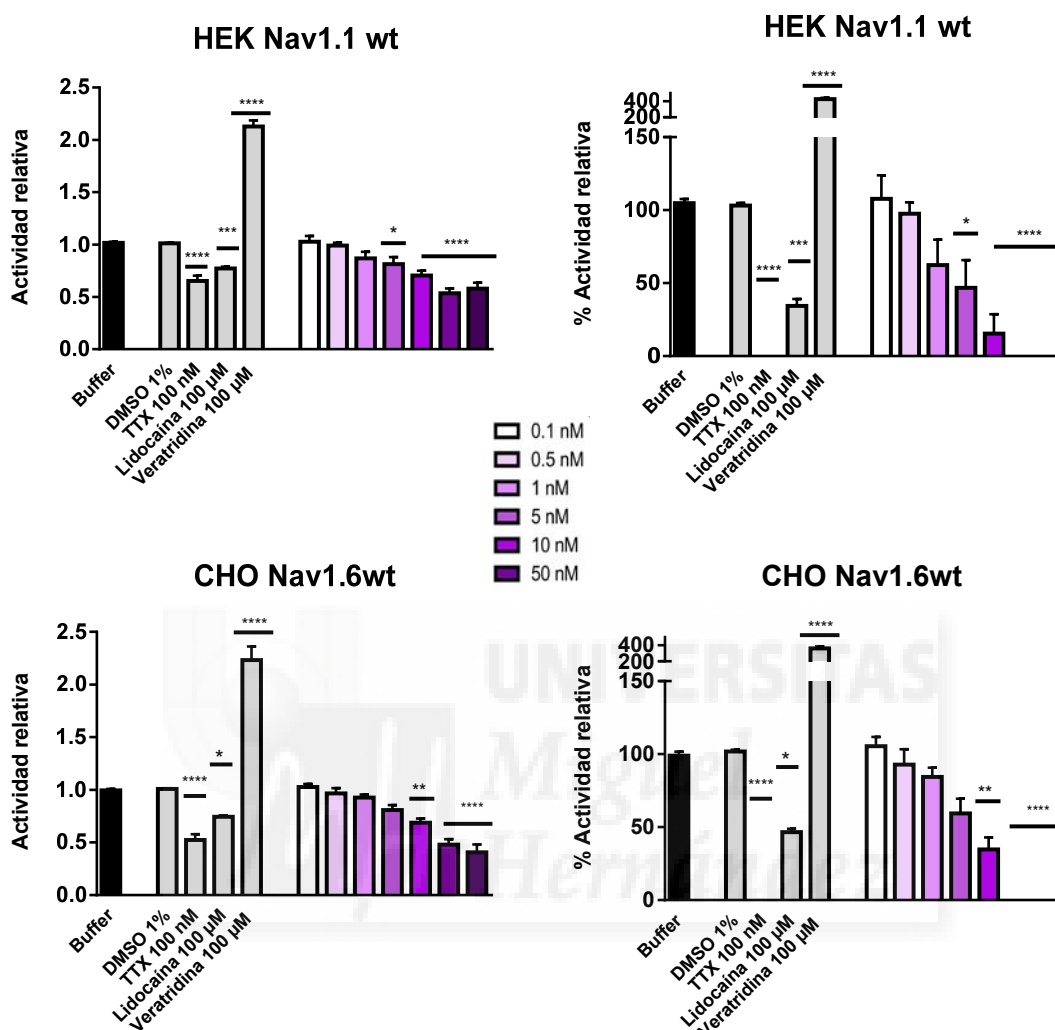


Figura 35. Actividad relativa de los canales Nav1.1 y Nav1.6 frente a TTX en dosis-respuesta. En la parte izquierda se representa la actividad relativa del canal. Para obtener el % de actividad del canal, mostrado a la derecha, se ajustan los valores tomando como referencia el 100% de actividad de los canales el obtenido con el buffer y el 0% la señal con TTX 100nM control utilizado en la puesta a punto para la homogeneidad de los resultados. Se observa el decremento de la actividad del canal con TTX de forma dosis dependiente, significativamente a partir de 5nM en Nav1.1 y de 10 nM en Nav1.6. Se representa la media \pm SEM, $n_{total} \geq 7$; N=3; **** $p < 0.0001$. Análisis simple de varianzas, ANOVA, seguido de un test de comparación múltiple de Dunnet de cada columna con la actividad en presencia únicamente de buffer.

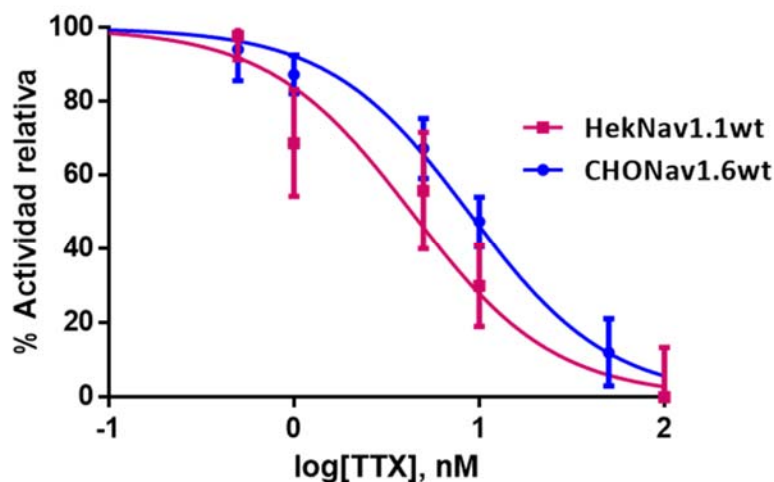


Figura 36. Sensibilidad a TTX de HEKNav1.1wt y CHONav1.6wt. Curva dosis-respuesta para la inhibición de las corrientes de sodio en presencia de TTX. Los valores normalizados fueron ajustados a la ecuación de Hill. La IC₅₀ y el cofactor de Hill se muestran en la tabla 13..

Estos valores se corresponden con los vistos en bibliografía y revisados en la introducción, para la sensibilidad a TTX, entre 5-10 nM para Nav1.1 y 2-10 nM para Nav1.6. Como era de esperar, el factor de Hill para ambos canales, indica cooperatividad negativa, es decir, solo hay un sitio de unión y una vez se ha unido una molécula de TTX, el canal queda bloqueado y no existe posibilidad de que se una otra molécula más.

Tabla 13. Parámetros de la sensibilidad a TTX de HEKNav1.1wt y CHONav1.6wt

Línea celular	IC ₅₀ (nM)	n _H
CHONav1.6wt	8.78 ± 1.21	-1.15 ± 0.25
HEKNav1.1wt	4.32 ± 1.35	-1.12 ± 0.34

5 CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO DE LA LIBRERÍA NIHCC

Se testaron 681 compuestos de los 747 de la librería de compuestos NIHCC (National of Institute of Health Clinical Collection) para buscar moduladores específicos que aumentaran las corrientes de sodio de Nav1.1 y bloquearan parcialmente las de Nav1.6.

Estos 747 compuestos se almacenan en placas especiales de 96 pocillos a una concentración de 10 mM 100% DMSO, distribuidos en dos series, NGP 104-01 a 104-06 (456 moléculas, 6 subseries) y NGP 201-01 a 201-04 (291 moléculas, 4 subseries). Así cada uno recibe la coordenada de la placa de A2 a H11 (las columnas 1 y 12 no contenían compuesto), y así fueron nombrados durante todos los experimentos hasta la selección de los candidatos. En el cribado, los compuestos fueron testados a 100 μ M (1%DMSO), por adición de 2.5 μ L a un total de 247.5 μ L de solución externa añadidos previamente a los pocillos de la placa de trabajo.

Las placas fueron diseñadas para su aprovechamiento máximo. A diferencia de otras técnicas de cribado, (fluorescencia, absorbancia, etc), es imposible predecir cuantas células entrarán en *whole-cell* en cada trampa, y la corriente de sodio de esa trampa será un sumatorio de todas las células. Además, se había comprobado que el vehículo de los compuestos, DMSO 1%, no afectaba a la intensidad de corriente, por lo que se decidió no incluirlo para normalizar la señal del compuesto respecto al vehículo, sino que como ya se ha indicado en el apartado de puesta a punto del método de análisis, la señal con el compuesto se relativiza a la señal inmediatamente anterior con solución externa. Habitualmente en los ensayos de cribado, en la misma placa se prueban, además de los compuestos a ensayar, un control sin tratamiento, control vehículo, control positivo y su vehículo. En nuestro caso, teníamos optimizado el método y esto no era necesario.

En la figura 37 se muestran un ejemplo del diseño que se utilizó para, optimizando las condiciones disponibles, cribar una subserie en 1 placa y media ya que el equipo permite trabajar con placas completas, dos zonas, o con una zona únicamente. En todos los patrones, el compuesto 8 (C8), era solución externa, utilizada como lavado entre compuestos. En cada

experimento, en el compuesto 7 (C7) de un patrón siempre se probaba veratridina 100 μM , como control positivo de activación y el C7 de otro patrón siempre contenía TTX 100 nM como control positivo de inhibición, siendo el resultado con TTX una forma de corroborar que lo que se estaban registrando eran corrientes de sodio. Además, el valor residual de actividad relativa que daba TTX 100nM de cada placa, era el valor con el que se normalizaba el resto de medidas de la placa.



RESULTADOS

		1	2	3	4	5	6		7	8	9	10	11	12
A	P1	Out	IN	A2	B2	C2	D2	P5	Out	IN	C5	D5	E5	F5
B		T1	T2	Buffer	TTX 100 nM	F2	E2		T1	T2	Buffer	A6	H5	G5
C	P2	Out	IN	G2	H2	A3	B3	P6	Out	IN	B6	C6	D6	E6
D		T1	T2	Buffer	E3	D3	C3		T1	T2	Buffer	H6	G6	F6
E	P3	Out	IN	F3	G3	H3	A4	P7	Out	IN	A7	B7	C7	D7
F		T1	T2	Buffer	D4	C4	B4		T1	T2	Buffer	G7	F7	E7
G	P4	Out	IN	E4	F4	G4	H4	P8	Out	IN	H7	A8	B8	C8
H		T1	T2	Buffer	Veratridina 100 µM	B5	A5		T1	T2	Buffer	F8	E8	D8

		1	2	3	4	5	6		7	8	9	10	11	12
A	P1	Out	IN	G8	H8	A9	B9	P5	Out	IN				
B		T1	T2	Buffer	TTX 100 nM	D9	C9		T1	T2				
C	P2	Out	IN	E9	F9	G9	H9	P6	Out	IN				
D		T1	T2	Buffer	C10	B10	A10		T1	T2				
E	P3	Out	IN	D10	E10	F10	G10	P7	Out	IN				
F		T1	T2	Buffer	B11	A11	H10		T1	T2				
G	P4	Out	IN	C11	D11	E11	F11	P8	Out	IN				
H		T1	T2	Buffer	Veratridina 100 µM	H11	G11		T1	T2				

Figura 37. Diseño final de las placas Ionflux para el cribado de NIHCC. En una placa y media se podía probar todos los compuestos de una subserie que constaba de una placa de 96 pocillos con la columna 1 y 12 vacías, es decir, del A2 al H11. Así se optimizaban las placas y el análisis resultaba más sencillo

A lo largo del cribado se han presentado problemas que se han tenido que solventar, como, por ejemplo, la existencia de “bloqueadores irreversibles” o excesivamente potentes que era imposible eliminar en los minutos posteriores del protocolo. Esto retrasó enormemente el cribado ya que los compuestos posteriores de ese patrón, en el curso del experimento quedaban anulados. En la figura 38 se muestra un ejemplo del tipo de gráficas obtenidas con estos bloqueadores irreversibles.

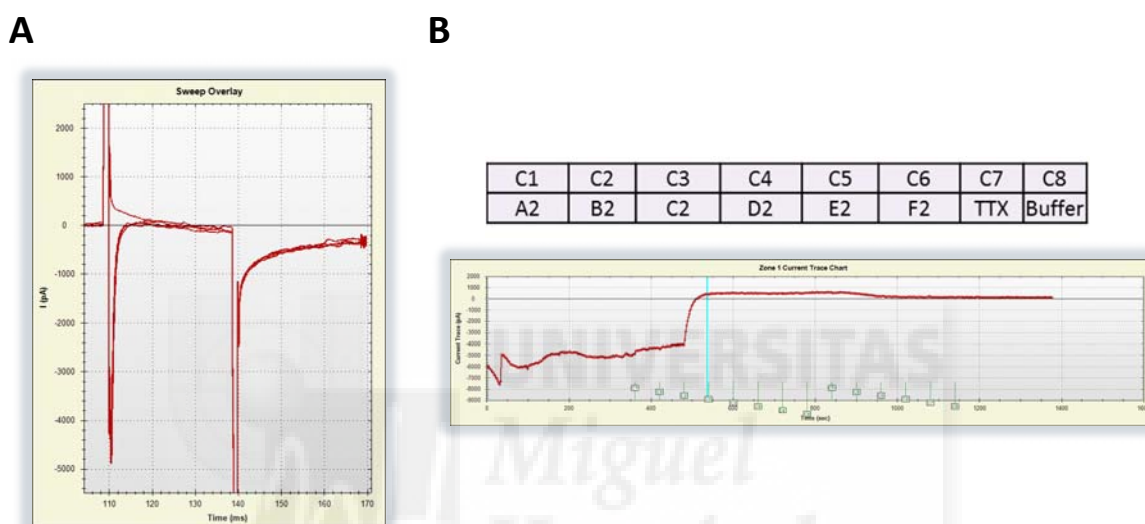


Figura 38. Efecto de un bloqueador irreversible sobre un canal de sodio. **A)** Intensidad de corriente máxima registrada con la solución externa frente a la intensidad nula al añadir el compuesto. **B)** Ejemplo de como el bloqueador irreversible en la posición C2 encubre el efecto de los compuestos posteriores.

En algunos casos, al repetir la medida con los siguientes compuestos enmascarados, incluso se encontraron hasta 3 bloqueadores irreversibles consecutivos.

La gran ventaja era poder cribar los mismos compuestos en las dos líneas, para las que buscamos el efecto opuesto. En la figura 39 se muestra un ejemplo, de molécula, concretamente el omeprazol, que parecía incrementar la actividad relativa en HEKNav1.1wt y reducirla en CHONav1.6wt, que era exactamente el efecto buscado.

Las 20 gráficas que representan el cribado de las 10 subseries en cada línea celular, se muestran, emparejadas por subserie, en el Anexo II (Figs. AII-1 a AII-10)

RESULTADOS

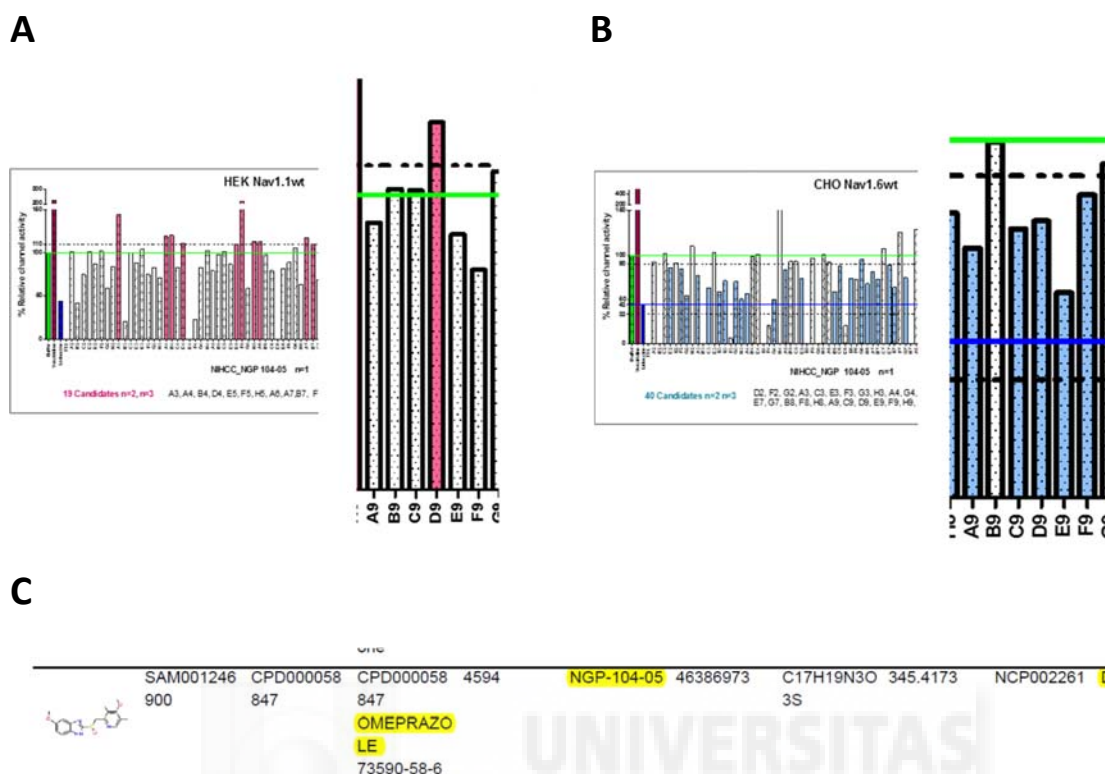


Figura 39. Efecto de una molécula en ambas líneas A) Gráfica del porcentaje de actividad relativa de NGP 104-05 sobre HEKNav1.1wt. A la derecha aparece ampliada el aumento de la actividad debida al compuesto NGP 104-05-D9 B) Efecto en CHONav1.6wt de la misma subserie que en (A) y la disminución de la actividad debida al D9. C) Identificación del compuesto NGP 104-05-D9 como Omeprazol.

De los 681 activos probados, el método de análisis permitió seleccionar **183** compuestos potenciales activadores de Nav1.1 y **294** potenciales bloqueadores de Nav1.6 (gráficas en el Anexo II, ya indicado).

Cómo ya se ha explicado, esperábamos que muchos de los activadores fueran falsos positivos por recuperación del canal tras un bloqueador; aun así, para la selección de los activadores se tomaron todas las moléculas que ofrecieran un incremento de la actividad por encima de un 110% del Nav1.1wt sin importar el efecto producido en Nav1.6. Para la selección de los bloqueadores, se seleccionaron los que disminuyeran la actividad del canal por debajo de un 90% sin llegar a producir el efecto de la TTX, y por supuesto que solo bloquearan Nav1.6wt.

En este momento, el proyecto tuvo que centrarse en los activadores de Nav1.1, ya que era el reto principal para el Síndrome de Dravet, por lo que se continuó con los 183 posibles activadores y únicamente en HEKNav1.1wt. Se testaron **170** compuestos ya que, por el proceso de puesta a punto y utilización, algunos se agotaron (representa una pérdida asumible del 9%). Los nuevos resultados se procesaron de manera análoga a la primera vuelta, que llamaremos “n1” y se presentaron en las gráficas mostradas en el anexo. El nuevo análisis permitió detectar nuevos falsos positivos generados por la propia complejidad del ensayo y además el estudio de los registros se hizo más exhaustivamente, no únicamente de los valores obtenidos con el método de análisis. Por esto, se decidió probar algún candidato, como por ejemplo el Amlexanox, seleccionado finalmente, que no ofrecía aumento de la actividad relativa pero el registro era el típico de un activador que retrasaba la inactivación. (Fig. 40) Esto nos dio idea de que los datos debían ser tratados con la apreciación subjetiva del efecto y no únicamente de forma bioinformática.

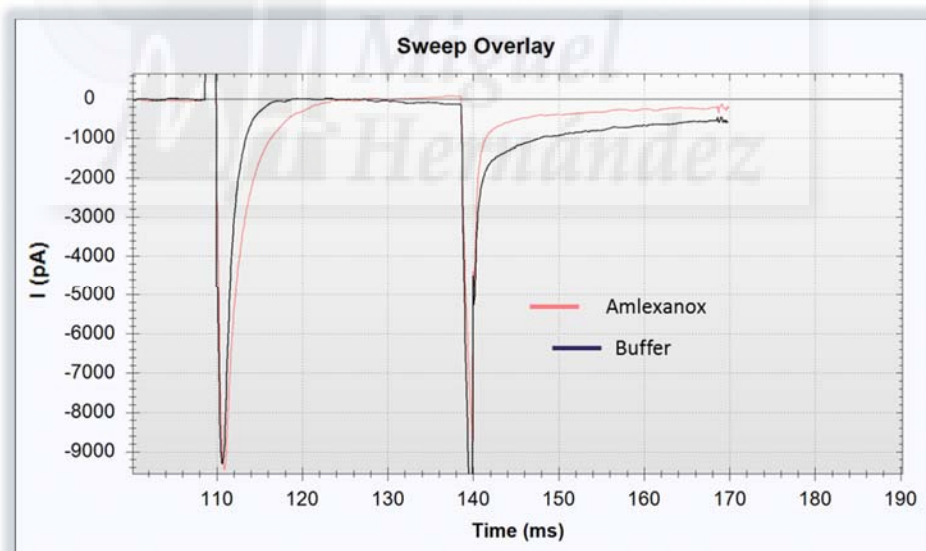


Figura 40. Registro de Nav1.1 con Amlexanox en el “n2”. En negro se muestra el registro de Nav1.1 en presencia de buffer y en naranja la corriente al adicionar Amlexanox 100 μ M.

RESULTADOS

Tras la segunda vuelta, “n2”, los nuevos candidatos, fueron en este caso **37** potenciales activadores. En el Anexo II se muestran las gráficas obtenidas del “n2” con los candidatos seleccionados (Figs. AII-11 a AII15).

A continuación, se procedió al ensayo “n3”. De los 37, se analizaron **30** (8%, mínimo porcentaje de pérdidas similar al caso anterior). El análisis más exhaustivo de los resultados mostraba que algunos de los potenciales activadores eran psicofármacos y se consideró que no era buena opción seguir con su estudio. En el Anexo II se muestran las gráficas de la actividad relativa de HEKNav1.1wt, con la puesta en común de las tres vueltas (Fig.AII-16).

Tras el nuevo análisis, y analizando los resultados obtenidos para el “n1” de Nav1.6, se decidió hacer un “n2” con aquellas moléculas con registros favorables en Nav1.1 y que bloquearan, o tuvieran un efecto negativo o dudoso sobre Nav1.6. Un total de **4** compuestos fueron probados en el “n2” para Nav1.6.

De nuevo, el estudio de los datos del % actividad relativa y de los registros para ambos canales, nos llevó a seleccionar **3** que parecía que aumentaban específicamente la corriente del Nav1.1. En el Anexo II se muestran los registros de corrientes de sodio, estudiados para la elección con los 4 candidatos, sobre ambas líneas celulares (Figs. AII-17 a AII-20).

El Olmesartan fue seleccionado desde el “n2” ya que los resultados previos eran prometedores y debido a sus características bioactivas en bibliografía, aunque no se pudo hacer el “n3” en el Nav1.1, ni el “n2” en Nav1.6 por falta de stock. Se ha añadido el Olmesartán a la gráfica resumen de las tres vueltas, únicamente con dos medidas, ya que fue uno de los seleccionados (Fig. AII-16).

En la figura 41 se muestra un resumen esquemático del proceso de cribado y selección de los candidatos.



Figura 41. Esquema del proceso de cribado y selección de los 4 candidatos.

6 VALIDACIÓN DE LOS CANDIDATOS

Los candidatos seleccionados fueron validados mediante el registro de la actividad de ambos canales Nav1.1 y Nav1.6, frente a diferentes concentraciones para obtener una posible curva dosis respuesta y si se diera el caso calcular la EC_{50} . La concentración testada para el cribado, 100 μ M, es la concentración orientativa para el cribado de futuros fármacos ya que nunca deben superar esta dosis.

Puesto que se contaba con 7 condiciones por patrón de las placas para testar, además del buffer para lavado en la condición 8, las concentraciones elegidas fueron 0.1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M.

El método de análisis que se aplicó fue el mismo que para el cribado, utilizando de nuevo la actividad en presencia del compuesto, relativizada a la actividad en el instante anterior únicamente en presencia de buffer. La normalización entre 0% el valor de la actividad relativa con TTX y 100% únicamente con buffer, se realizó con los mismos valores de la selección de controles para mantener la homogeneidad.

La estadística no mostró diferencias significativas en la actividad en presencia de ninguno de los candidatos, aunque era un resultado esperado ya que el aumento de actividad o variación del pico de los candidatos durante el cribado era muy sutil a la máxima concentración (Figs.42 y 43)

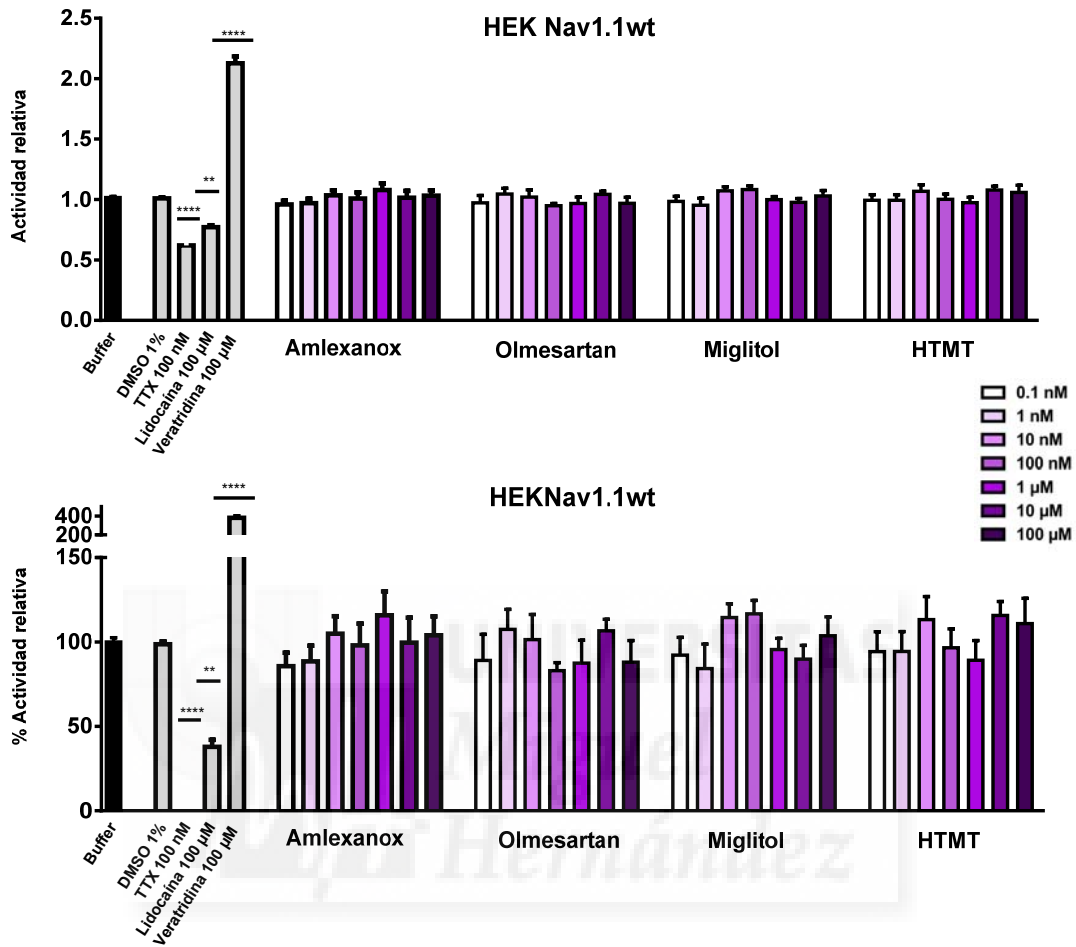


Figura 42. Actividad relativa de HEKNav1.1wt frente a los candidatos en dosis respuesta.

En la parte superior se representa la actividad relativa. En la parte inferior, se muestra el porcentaje de actividad relativa donde 100% de actividad de los canales es el obtenido con el buffer y el 0% la señal con TTX 100nM control utilizado en la puesta a punto para la homogeneidad. No se observa inhibición estadísticamente significativa por parte de ninguno de los candidatos. Se representa la media \pm SEM, ntotal \geq 9; N=3; **** p < 0.0001. Análisis simple de varianzas, ANOVA, seguido de un test de comparación múltiple de Dunnett de cada columna con la actividad en presencia únicamente de buffer.

RESULTADOS

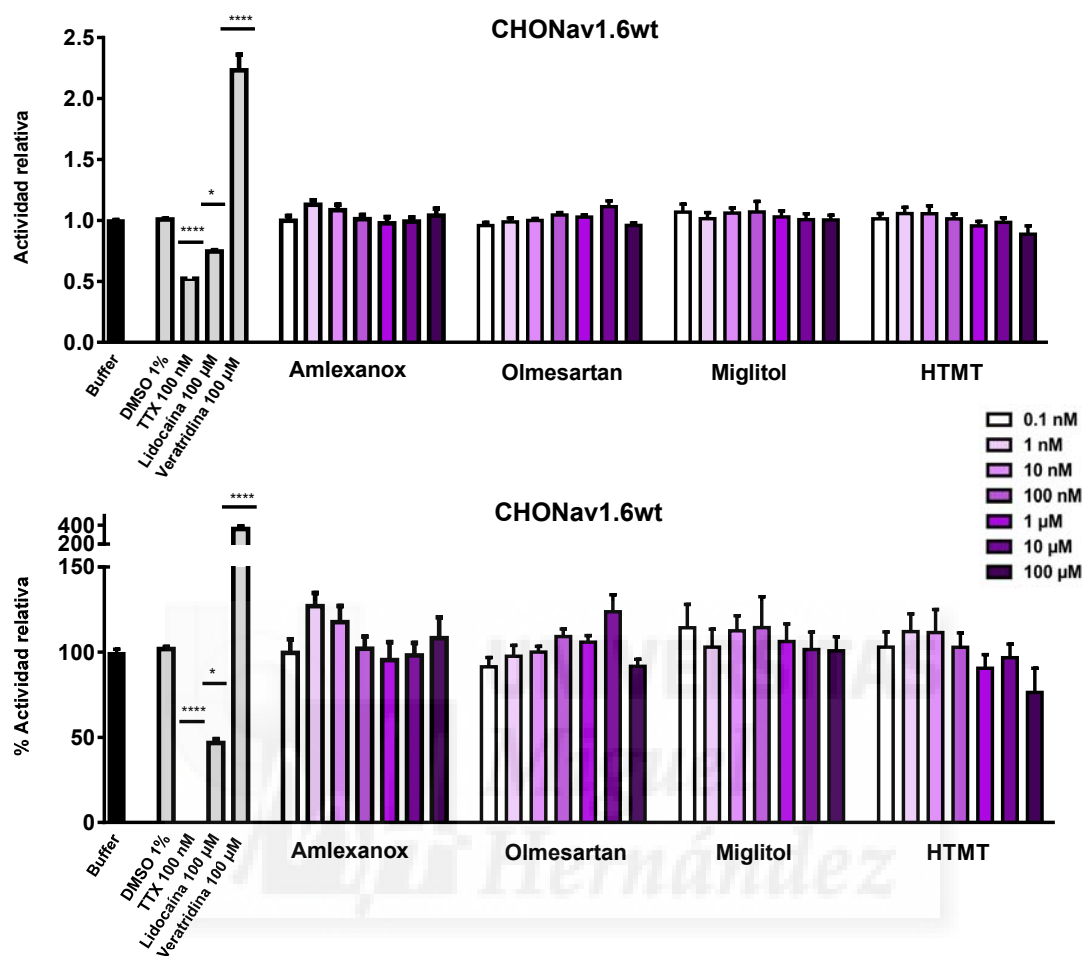


Figura 43. Actividad relativa de CHONav1.6wt frente a los candidatos en dosis respuesta.

En la parte superior se representa la actividad relativa. En la parte inferior, se muestra el porcentaje de actividad relativa donde 100% de actividad de los canales el obtenido con el buffer y el 0% la señal con TTX 100nM control utilizado en la puesta a punto para tener resultados homogéneos. No se observa inhibición estadísticamente significativa por parte de ninguno de los candidatos Se representa la media \pm SEM, ntotal \geq 9; N=3; **** p< 0.0001. Análisis simple de varianzas, ANOVA, seguido de un test de comparación múltiple de Dunnet de cada columna con la actividad en presencia únicamente de buffer.

La tabla 14 muestra un resumen de los 4 candidatos y algunas características mencionadas en la sección de materiales y métodos.

Tabla 14. Resumen de los 4 candidatos seleccionados

		Amlexanox	Olmesartan	Miglitol	HTMT
Aprobado para:		Antiinflamatorio (dérmico)	Hipertensión	Diabetes	Antihistamínico
Ensayos en epilepsia:		No, pero una patente lo nombra como activador de SCNxA	Si, en ratas	No	No
Cribado	Activa Nav1.1	Si	Si	Si	Si
	Activa Nav1.6	No	No	No	No
Validación Análisis Estadístico	Activa Nav1.1	No	No	No	No
	Efecto en Nav1.6	No	No	No	No

Puesto que no se conocen activadores de canales de sodio que no provoquen un efecto grave o letal, como las neurotoxinas, el hecho de no obtener aumento significativo de la actividad del Nav1.1 no creemos deba ser motivo para descartar definitivamente estas moléculas.

Aunque las diferencias en la actividad no son significativas se observa en las gráficas como la actividad de ambos canales se ve modificada, aunque no de forma dosis-dependiente. Por este motivo, los candidatos deberían ser, como mínimo, corroborados o descartados, utilizando la técnica de *patch-clamp* manual, ya que para los pacientes con Síndrome de Dravet, un mínimo aumento de la actividad de las neuronas afectadas podría conllevar un gran aumento de la calidad de vida.

Cabe destacar además, que entre un cribado de 681 moléculas en dos líneas, dos de los 4 candidatos han sido relacionados anteriormente con canales de sodio, para el caso del Amlexanox²²⁷ o con epilepsia en el caso del Olmesartan²³². La técnica de *patch-clamp* automática ha demostrado ser un buen método para realizar cribados electrofisiológicos de alto rendimiento, poco factibles hasta ahora por la complejidad de la técnica manual.

7 THC-CL1

Uno de los proyectos de cribado de nuevas moléculas para el Síndrome de Dravet se realizó en el 2015-2016, en colaboración con *Dravet Syndrome European Foundation* y la empresa Theracule Pharma (Luxemburgo). Se testaron librerías de extractos medicinales de plantas en peces zebra Dravet. Estos peces mostraban los signos típicos de este síndrome, es decir, epilepsia y crisis desencadenadas por hipertermia, hiperactividad y problemas motores. Otro estudio de caracterización farmacológica con este modelo Dravet, demostró que responden bien por ejemplo a agonistas de serotonina como la fenfluramina, o a Valproato, pero no responden a carbamazepinas ²⁵⁶.

De este cribado de extractos naturales en pez cebra surgió un candidato, contenido en el curry, que tenía efecto anticonvulsivo protector, ante diferentes estímulos, entre ellos la hipertermia. Otros aspectos fisiopatológicos de este síndrome, relacionados con los problemas motores e incluso la letalidad también se vieron disminuidos. Este extracto fue probado también en el modelo ratón Dravet, con similares resultados (datos no mostrados por confidencialidad).

Ya que este extracto provocaba *in vivo* algunos de los efectos paliativos buscados para SD, se quiso conocer el mecanismo de acción de este extracto, y comprobar si modulaba canales de sodio a través de alguno de los dos canales de sodio con los que se ha trabajado en esta tesis doctoral, Nav1.1 y Nav1.6.

Este extracto fue probado a las mismas concentraciones que los 4 candidatos del cribado, 0.1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M. Los datos fueron tratados con el mismo método de análisis y representados utilizando los mismos criterios. La no presencia de diferencias significativas en la actividad de los canales Nav1.1 y Nav1.6, corroborada con el análisis visual de los registros, parece indicar que este extracto no está modificando la sintomatología convulsiva de los modelos animales con Síndrome de Dravet a través de los principales canales de sodio implicados (Fig 44)

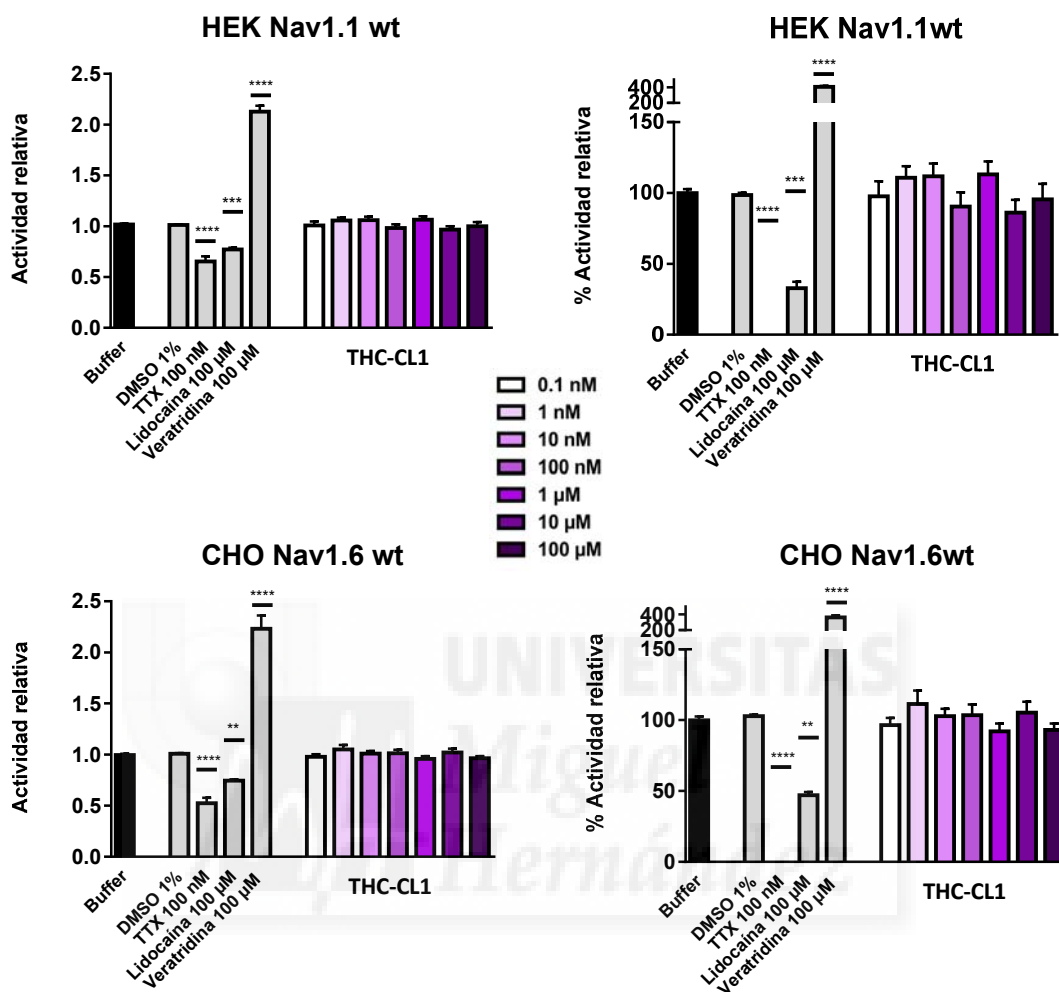


Figura 44. Actividad relativa de los canales Nav1.1 y Nav1.6 frente a THC-CL1 en dosis respuesta. En la parte izquierda se representa la actividad relativa del canal. Para obtener el % de actividad del canal, mostrado a la derecha, se ajustan los valores tomando como referencia el 100% de actividad de los canales el obtenido con el buffer y el 0% la señal con TTX 100nM control utilizado en la puesta a punto para la homogeneidad de los resultados. No hay diferencias significativas en la actividad de los canales en presencia del THC-CL1. Se representa la media \pm SEM, ntotal \geq 9; N=3; **** p< 0.0001. Análisis simple de varianzas, ANOVA, seguido de un test de comparación múltiple de Dunnet de cada columna con la actividad en presencia únicamente de buffer.



DISCUSIÓN

El Síndrome de Dravet es una enfermedad rara causada en más del 80% de los casos por mutaciones con pérdida de función en un alelo del gen *SCN1A*. Desde el año 2000, más de 800 mutaciones diferentes en este gen, han sido genotipadas como las responsables de esta encefalopatía refractaria^{105, 108, 131, 139, 250, 257}. De estas, más de 200 han sido descubiertas gracias al proyecto de diagnóstico genético de la Fundación Síndrome de Dravet en España, llevado a cabo por el INGEMM del Hospital de la Paz de Madrid.

El proyecto que dio lugar a esta tesis doctoral comenzó en el 2012 en colaboración con el proyecto de diagnóstico genético. Los genotipados de los pacientes proporcionados por el INGEMM y la relación fenotipo-genotipo a través de la historia clínica, sentaban las bases de la principal meta de este proyecto, es decir, la búsqueda de moléculas que fueran capaces de generar un aumento de función selectivo en los canales dañados, no funcionales. Además, se intentarían localizar antagonistas específicos del canal de sodio Nav1.6 del que se tenía constancia de un aumento de función¹⁵⁶. Con estos objetivos claros comenzó, a nuestro conocimiento, el primer cribado farmacogenómico realizado para el Síndrome de Dravet.

Para realizar un cribado de moléculas bioactivas que modulen la actividad de una proteína concreta, es necesario contar con un sistema *in vitro* o *in vivo* donde estudiarla, una técnica de medida rápida y efectiva y las librerías de compuestos que se quieran testar.

Para el estudio funcional de los canales iónicos, se ha contado desde los años 50, gracias a Hodgkin y Huxley²⁰⁵⁻²⁰⁸, con la técnica de *voltage-clamp* y con la de *patch-clamp* desde los 70s desarrollada por Neher y Sakmann²⁰²⁻²⁰⁴. A principios del 2000 ya comenzaba a hacerse patente la necesidad de equipos de medida que permitieran realizar cribados de alto rendimiento sobre canales iónicos, y que simularan las técnicas manuales. Varios equipos de distintas casas comerciales fueron lanzados al mercado con los consiguientes estudios comparativos y dando lugar a los primeros programas de cribados masivos y *drug discovery* sobre canales iónicos basados en medidas biofísicas²⁵⁸⁻²⁶².

Uno de estos equipos de medida de electrofisiología automatizada, en concreto el Ionflux-16™ (Fluxion Biosciences, Molecular Devices), fue adquirido por nuestro laboratorio, como

parte de la plataforma para investigación sobre dolor neuropático y otras canalopatías. Casi simultáneamente a esta tesis doctoral, comenzó a desarrollarse un proyecto en la Universidad de Santiago de Compostela sobre el efecto de un grupo de neurotoxinas marinas conocidas como PSP (*paralytic shellfish poisoning*), sobre 6 isoformas de canales de sodio, utilizando el mismo equipo de medida de Fluxion Biosciences ²⁶³.

A diferencia de otros métodos de cribado en los que es suficiente la transfección transitoria de las proteínas de interés, para poder realizar el estudio funcional con la plataforma de *patch-clamp* automatizada era necesario contar con líneas que expresaran de forma estable los canales que se querían modular. La generación de una línea heteróloga es un trabajo largo y no siempre sencillo, por lo que realizar el cribado sobre líneas estables de todos los mutantes seleccionados de *SCN1A*, se presentaba como una ardua tarea. Así surgió la idea de utilizar un sistema de generación de líneas estables isogénicas, que permite la integración y expresión del gen de interés en células de mamífero en un sitio específico del genoma. Esto se consigue creando una línea estable huésped que contiene un sitio de recombinación específica similar al utilizado por *Sacharomyces cerevisiae*, y que será el locus en el que se inserte posteriormente nuestro gen de interés con las oportunas mutaciones generadas por técnicas de clonación.

Las librerías de compuestos seleccionadas para el cribado, fueron entre otras: NIHCC, con 747 compuestos, finalmente ensayada por estar compuesta por moléculas que evitarían el largo proceso de ensayos clínicos (véase materiales y métodos) y *Prestwick Chemical Library*, una colección única de 1280 pequeñas moléculas, 100% aprobadas por la FDA. Esta última, sería muy interesante para el caso de mutaciones de proteína truncada, en principio descartadas. Por otros estudios de nuestro laboratorio, se tenía constancia de que algunos de los compuestos que la forman son capaces de generar ganancia de función, moléculas conocidas como "*Translational read-through*". Los mecanismos por los que podrían actuar estos compuestos son: 1) forzar al ribosoma, cambiando su conformación, "a leer" un codon de stop prematuro e introduciendo un aminoácido al azar 2) estabilizar el ARNm evitando que se degrade y permitiendo su traducción o 3) actuar como chaperonas estabilizando proteínas truncadas."

El inicio del proyecto durante la parte de biología molecular presentó más dificultades de las esperadas debido al clon del gen *SCN1A* que debía utilizarse para generar las líneas estables. Parecía que este gen daba lugar a un inserto de ADNc de gran tamaño, que resultaba tóxico para las bacterias transformadas y estas efectuaban reordenamientos durante la amplificación del plásmido, obteniendo muestras no secuenciables. Finalmente, se descubrió que el plásmido llevaba el fragmento IS3 de una transposasa de *E.coli*, que era la responsable de cada intento fallido. En colaboración con el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa de Madrid, encargado del proyecto de tráfico de proteínas, de la Fundación Síndrome de Dravet, se recibió una copia de un clon de *SCN1A*, y varias pruebas iniciales de inmunocitoquímica permitieron ver que daba lugar a un canal que se expresaba en membrana.

En este momento, el objetivo principal del proyecto cambió por varios motivos. La búsqueda de moléculas que potenciaran la actividad de la copia no funcional del Nav1.1 pasaba a un segundo plano ya que, la gran variedad de mutaciones distintas hacía difícil la selección de un número reducido de ellas para su estudio. En cambio, independientemente de la mutación, todos los casos poseían una copia sana, la cual, con un aumento de la actividad, por pequeña que fuese, contribuiría a un gran cambio en el fenotipo del paciente Dravet y su calidad de vida.

El segundo objetivo del proyecto era la búsqueda de moléculas que bloquearan parcialmente y de forma selectiva la actividad del Nav1.6, canal de neuronas excitatorias que al parecer estaba sobreexcitado o sobreexpresado debido a la pérdida de función de Nav1.1 en neuronas inhibitorias. Se comenzó la generación de una línea celular ND7/23 que expresara de forma estable este canal, gracias al clon pcDNA3-hNav_v1.6_r cedido por Michael Tamkun, PhD., de la Universidad de Colorado, pero no se continuó con ello ya que la Fundación de Dravet recibió la donación de las dos líneas celulares, HEKNav1.1wt y CHONav1.6wt, los dos canales de interés para el estudio farmacológico. La generación de las líneas estables silvestres ya no era necesaria, pudiéndonos centrar en la puesta a punto de la técnica de medida y el cribado de las librerías de moléculas bioactivas.

Es cierto que el trabajo hecho en esta tesis doctoral ha sido, más que un cribado en sí, la puesta a punto una técnica de medida. La caracterización de dos líneas celulares con diferente *background*, ha permitido definir ciertos parámetros de cultivo y protocolos de medida que proporcionan las bases para el diseño de otros proyectos de cribado. Algunos de los puntos llevados a cabo, como el cálculo del Factor Z, se hicieron al inicio del proyecto, durante la puesta a punto, y con el conocimiento que se tenía en ese momento. A pesar de que el valor de este factor era desfavorable, se continuó con el cribado porque la acción del antagonista elegido, la lidocaína, era estadísticamente valorable y cualitativamente visible. Muy probablemente en el momento actual y con un mayor conocimiento de la técnica se hubiera calculado tomando una muestra mayor, de distintas placas, utilizando varios antagonistas y se revisaría el cálculo. Hay estudios que sugieren que el Factor Z para según qué cribados, es poco realista, y se ofrecen parámetros estadísticos alternativos ²⁶⁴.

Durante el curso del proyecto se han realizado estudios con otros canales, como, por ejemplo, TRPM8, TRPV1 o Kv1.1 expresados en células HEK. En concreto la puesta a punto del Ionflux™ para cribado en HEK Kv1.1, permitió realizar un trabajo fin de grado de nuestro laboratorio²⁶⁵.

El cribado de la librería NIHCC ha llevado finalmente a la selección de 4 candidatos que podrían activar de forma selectiva el canal Nav1.1wt, aunque desde el inicio del proyecto se tenía muy presente que no existían moléculas capaces de aumentar la actividad de canales de sodio y que no muestren efectos adversos. El método de análisis, utilizando el área bajo la curva de todo el registro y relativizado al momento anterior a la adición del compuesto, solo con solución externa, ha resultado ser efectivo para los controles positivos de activación e inhibición, y para los candidatos bloqueadores. Es probable, que el aumento sutil que pudiéramos encontrar en un potencial activador selectivo de sodio, no sea fácilmente detectable de forma cuantitativa y/o estadística y sea necesario el estudio detallado de los registros. Pero el hecho de que, entre los 4 candidatos seleccionados, de entre 681, se encuentren dos relacionados con epilepsia o canales de sodio no creemos sea casual. Por este motivo, se considera que el estudio exhaustivo de al menos 3 de los candidatos seleccionados, Amlexanox, Olmesartan y HTMT, podría ser una línea a seguir. El Amlexanox, en concreto,

publicado como “*translational read-through*”²²⁶, comparte características con otros *orphan-drug* actuales, aprobados por ejemplo para la distrofia muscular de Duchenne, y recientemente incluídos en un ensayo clínico para Síndrome de Dravet^{266, 267}. Además, toda la información obtenida acerca de inhibidores de canales de sodio, selectivos o no del Nav1.6, podría tomarse también como punto de partida para la selección de otros candidatos para validación.

Diferentes farmacéuticas y grupos de investigación están detrás de la búsqueda de un fármaco efectivo para el Síndrome de Dravet. Hace unos años, la compañía danesa Lundbeck, comenzó la búsqueda de compuestos que activaran Nav1.1 de forma selectiva y sirviera por ejemplo, como tratamiento en epilepsia, Alzheimer y/o esquizofrenia^{268, 269}. Otras compañías se han centrado en el estudio de bloqueadores selectivos de Nav1.6, por ejemplo, algunas moléculas eficaces en modelos animales con epilepsias debidas a mutaciones con ganancia de función del gen *SCN8A* (www.xenon-pharma.com/product-candidates/dravet-syndrome/)

Los programas tradicionales de *drug discovery* siguen los pasos desde el cribado *in vitro*, de miles de moléculas, obteniendo un número reducido de candidatos, que se testaban finalmente en modelos animales, ratón o rata habitualmente, antes de pasar a ensayos clínicos en pacientes. La generación de modelos animales de enfermedades que puedan sustituir a modelos murinos, con ciclos vitales más cortos y alto índice reproductivo, permiten la caracterización farmacológica directamente en sistema nativo, por ejemplo, en pez cebra Dravet, o en *Drosophila melanogaster*, el último protagonista de la familia de modelos Dravet. Así surgió un extracto natural, el THC-CL1, de Theracule Pharma, que disminuía *in vivo*, en pez cebra y ratón Dravet, la aparición de crisis convulsivas y otros problemas motores. La posibilidad de contar con líneas celulares bien caracterizadas que expresan los canales de sodio Nav1.1 y Nav1.6 implicados en el Síndrome de Dravet, y una técnica de medida ya puesta a punto permitió comprobar que esta molécula no modula la actividad de estos canales y el mecanismo de acción implicaría a otro u otros receptores. Esto, lejos de ser un resultado negativo, permite asegurar que este candidato no provocará efectos patológicos en el síndrome de Dravet u otras epilepsias refractarias a bloqueadores de canales de sodio.

Recientemente se ha publicado un estudio con un bloqueador de canales de sodio, en principio no recomendable para Dravet, que inesperadamente mejoraba el fenotipo de un ratón *Scn1a*^{+/-} eliminando las crisis espontáneas y que sugiere la reducción en los niveles de proteína de Nav1.6 del hipocampo²⁷⁰. Esto anima a continuar con el estudio de la información sobre bloqueadores obtenidos en nuestro cribado.

La idea inicial del proyecto reflejado en esta tesis doctoral, de agilizar la llegada al paciente de un posible fármaco con el cribado de librerías como la NIHCC, sigue impulsando nuevos retos y aparición de potenciales candidatos. Por ejemplo, el caso de dos medicamentos huérfanos (EPX-100 y EPX-200), un modulador de la vía de la serotonina, y un antihistamínico de primera generación de los años 50, que al parecer también actúa modulando el receptor de serotonina 5HT. Estos candidatos fueron rescatados por su efecto anticonvulsivo en una plataforma de pez cebra Dravet en San Francisco, habiendo sido probado el segundo en un grupo de pacientes Dravet del hospital de Colorado, con resultados satisfactorios (www.newswire.com/news/epygenix-therapeutics-receives-orphan-drug-designation-from-the-u-s-19369643). Como dato, el HTMT, uno de nuestros candidatos, es una molécula implicada en procesos antihistamínicos vía receptores H1 y H2. Otro caso similar es el del Canabidiol, rescatado como *orphan drug*, ya que reduce las crisis convulsivas en epilepsias infantiles, incluido el síndrome de Dravet, y estudiado por varios grupos en su versión natural y sintética¹⁹⁰.

La directriz de atacar el problema de base de la haploinsuficiencia del Nav1.1wt ha llevado a varios grupos a la búsqueda de una terapia que logre incrementar la expresión de la copia no mutada del gen. Parece que un ARN no codificante antisentido es el responsable de frenar la transcripción una vez se han conseguido el 50% de las copias. Usando compuestos basados en oligonucleótidos complementarios a esos ARN antisentido, han sido capaces de aumentar la expresión *in vitro* y en cerebro de ratón Dravet *knock-in*, con una significativa mejora en el fenotipo y la excitabilidad de las interneuronas del hipocampo²⁷¹. Otro grupo de investigación, este más cercano, en la Universidad de Navarra, está intentando desarrollar terapia génica introduciendo otra copia sana del gen mediante adenovirus (datos aún no publicados).

La búsqueda de un fármaco efectivo para el Síndrome de Dravet es una empresa en la que se deben aunar todos los esfuerzos: estudios demográficos de pacientes diagnosticados con SD, respuesta a la medicación designada y ensayos clínicos de nuevos fármacos ^{185, 272}, registro internacional de pacientes y relación fenotipo-genotipo, avances en la caracterización molecular que provoca el espectro tan amplio de signos y síntomas en SD y otras encefalopatías severas ²⁷³ y la aparición de nuevas moléculas a estudio , como las aportadas en esta tesis doctoral.

Así, la puesta a punto de la plataforma automática de *patch-clamp* y del cultivo celular de las dos líneas que expresan Nav1.1wt y Nav1.6wt ofrece la posibilidad de cribar otras muchas librerías de compuestos en dichas líneas y la generación de líneas isogénicas mutantes para continuar con el cribado farmacogenómico para el Síndrome de Dravet.





CONCLUSIONES

1. Las líneas celulares HEKNav1.1wt y CHONav1.6wt muestran una expresión estable de las subunidades alfa de los canales Nav1.1 y Nav1.6 humanos, respectivamente. En ningún caso se observa la presencia de subunidades Nav β auxiliares β 1 o β 2.
2. Tanto HEKNav1.1wt como CHONav1.6wt pueden ser analizadas por técnicas analíticas complementarias como son la medida de intensidad de fluorescencia o el registro de corrientes iónicas a través de membranas celulares.
3. La plataforma automática de *patch-clamp* IONFLUX-16™ permite realizar cribados de alto rendimiento basados en la funcionalidad de canales iónicos.
4. El cribado de la librería de moléculas bioactivas NIHCC, ha identificado tanto activadores como inhibidores de Nav1.1 y Nav1.6 susceptibles de estudiarse cualitativamente por la técnica manual de *patch-clamp*.
5. Nuestra tecnología permite probar otras librerías de compuestos utilizando las líneas celulares HEKNav1.1wt y CHONav1.6wt. Así, de una forma eficaz se pueden realizar cribados de alto rendimiento para proyectos de *drug discovery* aplicados tanto para el Síndrome de Dravet como para otras patologías asociadas con canales de sodio.



BIBLIOGRAFÍA

1. Hübner, C. A.; Jentsch, T. J. Ion channel diseases. *Human molecular genetics* **2002**, *11*, 2435-2445.
2. Rouleau, G.; Gaspar, C. *Ion channel diseases*. Academic Press: 2011; Vol. 63.
3. Al-Ghamdi, F.; Darras, B. T.; Ghosh, P. S. Spectrum of nondystrophic skeletal muscle channelopathies in children. *Pediatric Neurology* **2017**.
4. Iamshanova, O.; Fiorio Pla, A.; Prevarskaya, N. Molecular mechanisms of tumor invasion: regulation by calcium signals. *The Journal of Physiology* **2017**.
5. Corrado, D.; Zorzi, A. Sudden death in athletes. *Int J Cardiol* **2017**.
6. Spillane, J.; Kullmann, D.; Hanna, M. Genetic neurological channelopathies: molecular genetics and clinical phenotypes. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* **2016**, *87*, 37-48.
7. Catterall, W. A.; Kalume, F.; Oakley, J. C. NaV1.1 channels and epilepsy. *J Physiol* **2010**, *588*, 1849-59.
8. Hildebrand, M. S.; Dahl, H.-H. M.; Damiano, J. A.; Smith, R. J.; Scheffer, I. E.; Berkovic, S. F. Recent advances in the molecular genetics of epilepsy. *Journal of medical genetics* **2013**, jmedgenet-2012-101448.
9. Yu, F. H.; Yarov-Yarovoy, V.; Gutman, G. A.; Catterall, W. A. Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacological reviews* **2005**, *57*, 387-395.
10. Carmeliet, E. Ion channel agonists: expectations for therapy. *Eur Heart J* **1991**, *12* Suppl F, 30-7.
11. Fertig, N.; Farre, C. Renaissance of ion channel research and drug discovery by patch clamp automation. *Future Med Chem* **2010**, *2*, 691-5.
12. Fresno, N.; Pérez-Fernández, R.; Goicoechea, C.; Alkorta, I.; Fernández-Carvajal, A.; De la Torre-Martinez, R.; Quirce, S.; Ferrer-Montiel, A.; Martín, M. I.; Goya, P. Adamantyl Analogues of Paracetamol as Potent Analgesic Drugs via Inhibition of TRPA1. *PloS one* **2014**, *9*, e113841.
13. Ferrer-Montiel, A.; Fernández Carvajal, A.; Torre-Martínez, R. d. I.; González-Muñiz, R.; Pérez de Vega, M. J.; Martín-Martínez, M.; Bonache de Marcos, M. Á.; Balsera, B. Péptidos bloqueantes de termoreceptores y sus usos. **2015**.
14. Hanukoglu, I.; Hanukoglu, A. Epithelial sodium channel (ENaC) family: Phylogeny, structure–function, tissue distribution, and associated inherited diseases. *Gene* **2016**, *579*, 95-132.
15. Rossier, B. C.; Baker, M. E.; Studer, R. A. Epithelial sodium transport and its control by aldosterone: the story of our internal environment revisited. *Physiological reviews* **2015**, *95*, 297-340.
16. Lin, S.-H.; Sun, W.-H.; Chen, C.-C. Genetic exploration of the role of acid-sensing ion channels. *Neuropharmacology* **2015**, *94*, 99-118.
17. Hanukoglu, I. ASIC and ENaC type sodium channels: Conformational states and the structures of the ion selectivity filters. *The FEBS Journal* **2016**, n/a-n/a.
18. Vukicevic, M.; Kellenberger, S. Modulatory effects of acid-sensing ion channels on action potential generation in hippocampal neurons. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **2004**, *287*, C682-C690.
19. Kellenberger, S.; Schild, L. International union of basic and clinical pharmacology. XCI. Structure, function, and pharmacology of acid-sensing ion channels and the epithelial Na⁺ channel. *Pharmacological Reviews* **2015**, *67*, 1-35.
20. Jasti, J.; Furukawa, H.; Gonzales, E. B.; Gouaux, E. Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature* **2007**, *449*, 316-323.
21. Gonzales, E. B.; Kawate, T.; Gouaux, E. Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors. *Nature* **2009**, *460*, 599-604.
22. Brackenbury, W. J.; Davis, T. H.; Chen, C.; Slat, E. A.; Detrow, M. J.; Dickendesher, T. L.; Ranscht, B.; Isom, L. L. Voltage-gated Na⁺ channel beta1 subunit-mediated neurite outgrowth requires Fyn kinase and contributes to postnatal CNS development in vivo. *J Neurosci* **2008**, *28*, 3246-56.
23. Brackenbury, W. J.; Isom, L. L. Voltage-gated Na⁺ channels: potential for beta subunits as therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets* **2008**, *12*, 1191-203.

24. Brackenbury, W. J.; Yuan, Y.; O'Malley, H. A.; Parent, J. M.; Isom, L. L. Abnormal neuronal patterning occurs during early postnatal brain development of *Scn1b*-null mice and precedes hyperexcitability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110*, 1089-94.
25. Black, J. A.; Waxman, S. G. Noncanonical roles of voltage-gated sodium channels. *Neuron* **2013**, *80*, 280-291.
26. Beckh, S.; Noda, M.; Lübbert, H.; Numa, S. Differential regulation of three sodium channel messenger RNAs in the rat central nervous system during development. *The EMBO journal* **1989**, *8*, 3611.
27. Vacher, H.; Mohapatra, D. P.; Trimmer, J. S. Localization and targeting of voltage-dependent ion channels in mammalian central neurons. *Physiol Rev* **2008**, *88*, 1407-47.
28. Catterall, W. A. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* **2000**, *26*, 13-25.
29. Plummer, N. W.; Meisler, M. H. Evolution and diversity of mammalian sodium channel genes. *Genomics* **1999**, *57*, 323-331.
30. George, A. L., Jr. Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *J Clin Invest* **2005**, *115*, 1990-9.
31. Yu, F. H.; Catterall, W. A. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol* **2003**, *4*, 207.
32. Clare, J. J.; Tate, S. N.; Nobbs, M.; Romanos, M. A. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets. *Drug Discovery Today* **2000**, *5*, 506-520.
33. Goldin, A. L. Resurgence of sodium channel research. *Annu Rev Physiol* **2001**, *63*, 871-94.
34. Mantegazza, M.; Catterall, W. A. Voltage-Gated Na⁺ Channels: Structure, Function, and Pathophysiology. In *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*, Noebels, J. L.; Avoli, M.; Rogawski, M. A.; Olsen, R. W.; Delgado-Escueta, A. V., Eds. National Center for Biotechnology Information (US) Michael A Rogawski, Antonio V Delgado-Escueta, Jeffrey L Noebels, Massimo Avoli and Richard W Olsen.: Bethesda (MD), **2012**.
35. Goldin, A. L. Evolution of voltage-gated Na⁺ channels. *Journal of Experimental Biology* **2002**, *205*, 575-584.
36. Lee, C. H.; Ruben, P. C. Interaction between voltage-gated sodium channels and the neurotoxin, tetrodotoxin. *Channels* **2008**, *2*, 407-412.
37. Wang, S. Y.; Wang, G. K. Voltage-gated sodium channels as primary targets of diverse lipid-soluble neurotoxins. *Cell Signal* **2003**, *15*, 151-9.
38. Noda, M.; Suzuki, H.; Numa, S.; Stühmer, W. A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II. *FEBS letters* **1989**, *259*, 213-216.
39. Terlau, H.; Heinemann, S. H.; Stühmer, W.; Pusch, M.; Conti, F.; Imoto, K.; Numa, S. Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS letters* **1991**, *293*, 93-96.
40. Payandeh, J.; Scheuer, T.; Zheng, N.; Catterall, W. A. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* **2011**, *475*, 353-358.
41. Heinemann, S. H.; Terlau, H. Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* **1992**, *356*, 441.
42. Catterall, W. A. Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. *Annual review of biochemistry* **1986**, *55*, 953-985.
43. GuY, H. R.; Seetharamulu, P. Molecular model of the action potential sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1986**, *83*, 508-512.
44. Stühmer, W.; Conti, F.; Suzuki, H.; Wang, X.; Noda, M.; Yahagi, N.; Kubo, H.; Numa, S. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* **1989**, *339*, 597.
45. Yarov-Yarovoy, V.; DeCaen, P. G.; Westenbroek, R. E.; Pan, C.-Y.; Scheuer, T.; Baker, D.; Catterall, W. A. Structural basis for gating charge movement in the voltage sensor of a sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**, *109*, E93-E102.
46. Ulbricht, W. Sodium channel inactivation: molecular determinants and modulation. *Physiological reviews* **2005**, *85*, 1271-1301.

47. Hille, B.; Leibowitz, M. D.; Sutro, J. B.; Schwarz, J. R.; Holan, G. In *Proteins of Excitable Membranes*. In B. Hille and D. M. Fambrough, e., Ed. 1987; pp 109-124.
48. Hodgkin, A. L.; Huxley, A. F. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *The Journal of physiology* **1952**, *116*, 449.
49. Yang, N.; George, A. L.; Horn, R. Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels. *Neuron* **1996**, *16*, 113-122.
50. Lamberti, P. W.; Rodríguez, V. Desarrollo del modelo matemático de Hodgkin y Huxley en neurociencias. *Electroneurobiología* **2007**, *15*, 31-60.
51. Cantrell, A. R.; Catterall, W. A. Neuromodulation of Na⁺ channels: An unexpected form of cellular plasticity. *Nature Reviews Neuroscience* **2001**, *2*, 397-407.
52. Goldin, A. L.; Snutch, T.; Lübber, H.; Dowsett, A.; Marshall, J.; Auld, V.; Downey, W.; Fritz, L. C.; Lester, H. A.; Dunn, R. Messenger RNA coding for only the alpha subunit of the rat brain Na channel is sufficient for expression of functional channels in *Xenopus* oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1986**, *83*, 7503-7507.
53. Isom, L. L.; De Jongh, K. S.; Patton, D. E.; Reber, B. F.; Offord, J.; Charbonneau, H.; Walsh, K.; Goldin, A. L.; Catterall, W. A. Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science* **1992**, *256*, 839-42.
54. Isom, L. L.; Ragsdale, D. S.; De Jongh, K. S.; Westenbroek, R. E.; Reber, B. F.; Scheuer, T.; Catterall, W. A. Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell* **1995**, *83*, 433-42.
55. Morgan, K.; Stevens, E. B.; Shah, B.; Cox, P. J.; Dixon, A. K.; Lee, K.; Pinnock, R. D.; Hughes, J.; Richardson, P. J.; Mizuguchi, K.; Jackson, A. P. beta 3: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, *97*, 2308-13.
56. Yu, F. H.; Westenbroek, R. E.; Silos-Santiago, I.; McCormick, K. A.; Lawson, D.; Ge, P.; Ferreira, H.; Lilly, J.; DiStefano, P. S.; Catterall, W. A.; Scheuer, T.; Curtis, R. Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. *J Neurosci* **2003**, *23*, 7577-85.
57. Kazen-Gillespie, K. A.; Ragsdale, D. S.; D'Andrea, M. R.; Mattei, L. N.; Rogers, K. E.; Isom, L. L. Cloning, localization, and functional expression of sodium channel β 1A subunits. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 1079-1088.
58. Moran, O.; Nizzari, M.; Conti, F. Endogenous expression of the β 1A sodium channel subunit in HEK-293 cells. *FEBS letters* **2000**, *473*, 132-134.
59. Qin, N.; D'andrea, M. R.; Lubin, M. L.; Shafae, N.; Codd, E. E.; Correa, A. M. Molecular cloning and functional expression of the human sodium channel β 1B subunit, a novel splicing variant of the β 1 subunit. *European journal of biochemistry* **2003**, *270*, 4762-4770.
60. Laedermann, C. J.; Syam, N.; Pertin, M.; Decosterd, I.; Abriel, H. beta1- and beta3- voltage-gated sodium channel subunits modulate cell surface expression and glycosylation of Nav1.7 in HEK293 cells. *Front Cell Neurosci* **2013**, *7*, 137.
61. Isom, L. L. Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *Neuroscientist* **2001**, *7*, 42-54.
62. Brackenbury, W. J.; Calhoun, J. D.; Chen, C.; Miyazaki, H.; Nukina, N.; Oyama, F.; Ranscht, B.; Isom, L. L. Functional reciprocity between Na⁺ channel Nav1.6 and beta1 subunits in the coordinated regulation of excitability and neurite outgrowth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 2283-8.
63. Maness, P. F.; Schachner, M. Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nature neuroscience* **2007**, *10*, 19-26.
64. Chen, C.; Westenbroek, R. E.; Xu, X.; Edwards, C. A.; Sorenson, D. R.; Chen, Y.; McEwen, D. P.; O'Malley, H. A.; Bharucha, V.; Meadows, L. S. Mice lacking sodium channel β 1 subunits display defects in neuronal

- excitability, sodium channel expression, and nodal architecture. *Journal of Neuroscience* **2004**, *24*, 4030-4042.
65. Lopez-Santiago, L. F.; Meadows, L. S.; Ernst, S. J.; Chen, C.; Malhotra, J. D.; McEwen, D. P.; Speelman, A.; Noebels, J. L.; Maier, S. K.; Lopatin, A. N. Sodium channel *Scn1b* null mice exhibit prolonged QT and RR intervals. *Journal of molecular and cellular cardiology* **2007**, *43*, 636-647.
 66. Wallace, R.; Scheffer, I.; Parasivam, G.; Barnett, S.; Wallace, G.; Sutherland, G.; Berkovic, S.; Mulley, J. Generalized epilepsy with febrile seizures plus: mutation of the sodium channel subunit SCN1B. *Neurology* **2002**, *58*, 1426-1429.
 67. Watanabe, H.; Darbar, D.; Kaiser, D. W.; Jiramongkolchai, K.; Chopra, S.; Donahue, B. S.; Kannankeril, P. J.; Roden, D. M. Mutations in sodium channel beta1- and beta2-subunits associated with atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* **2009**, *2*, 268-75.
 68. Watanabe, H.; Koopmann, T. T.; Le Scouarnec, S.; Yang, T.; Ingram, C. R.; Schott, J. J.; Demolombe, S.; Probst, V.; Anselme, F.; Escande, D.; Wiesfeld, A. C.; Pfeufer, A.; Kaab, S.; Wichmann, H. E.; Hasdemir, C.; Aizawa, Y.; Wilde, A. A.; Roden, D. M.; Bezzina, C. R. Sodium channel beta1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *J Clin Invest* **2008**, *118*, 2260-8.
 69. Patino, G. A.; Claes, L. R.; Lopez-Santiago, L. F.; Slat, E. A.; Dondeti, R. S.; Chen, C.; O'Malley, H. A.; Gray, C. B.; Miyazaki, H.; Nukina, N.; Oyama, F.; De Jonghe, P.; Isom, L. L. A functional null mutation of SCN1B in a patient with Dravet syndrome. *J Neurosci* **2009**, *29*, 10764-78.
 70. Medeiros-Domingo, A.; Kaku, T.; Tester, D. J.; Iturralde-Torres, P.; Itty, A.; Ye, B.; Valdivia, C.; Ueda, K.; Canizales-Quinteros, S.; Tusié-Luna, M. T. SCN4B-encoded sodium channel β 4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation* **2007**, *116*, 134-142.
 71. Yu, F. H.; Westenbroek, R. E.; Silos-Santiago, I.; McCormick, K. A.; Lawson, D.; Ge, P.; Ferriera, H.; Lilly, J.; DiStefano, P. S.; Catterall, W. A. Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **2003**, *23*, 7577-7585.
 72. Oyama, F.; Miyazaki, H.; Sakamoto, N.; Becquet, C.; Machida, Y.; Kaneko, K.; Uchikawa, C.; Suzuki, T.; Kurosawa, M.; Ikeda, T.; Tamaoka, A.; Sakurai, T.; Nukina, N. Sodium channel beta4 subunit: down-regulation and possible involvement in neuritic degeneration in Huntington's disease transgenic mice. *J Neurochem* **2006**, *98*, 518-29.
 73. Brackenbury, W. J.; Isom, L. L. Na Channel beta Subunits: Overachievers of the Ion Channel Family. *Front Pharmacol* **2011**, *2*, 53.
 74. Catterall, W. A. Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *J Physiol* **2012**, *590*, 2577-89.
 75. Litt, M.; Luty, J.; Kwak, M.; Allen, L.; Magenis, R.; Mandel, G. Localization of a human brain sodium channel gene (SCN2A) to chromosome 2. *Genomics* **1989**, *5*, 204-208.
 76. Malo, D.; Schurr, E.; Dorfman, J.; Canfield, V.; Levenson, R.; Gros, P. Three brain sodium channel α -subunit genes are clustered on the proximal segment of mouse chromosome 2. *Genomics* **1991**, *10*, 666-672.
 77. Meisler, M. H.; O'Brien, J. E.; Sharkey, L. M. Sodium channel gene family: epilepsy mutations, gene interactions and modifier effects. *The Journal of physiology* **2010**, *588*, 1841-1848.
 78. Martin, M. S.; Tang, B.; Ta, N.; Escayg, A. Characterization of 5' untranslated regions of the voltage-gated sodium channels SCN1A, SCN2A, and SCN3A and identification of cis-conserved noncoding sequences. *Genomics* **2007**, *90*, 225-235.
 79. Guo, F.; Yu, N.; Cai, J. Q.; Quinn, T.; Zong, Z. H.; Zeng, Y. J.; Hao, L. Y. Voltage-gated sodium channel Nav1.1, Nav1.3 and beta1 subunit were up-regulated in the hippocampus of spontaneously epileptic rat. *Brain Res Bull* **2008**, *75*, 179-87.

80. Frank, H. Y.; Mantegazza, M.; Westenbroek, R. E.; Robbins, C. A.; Kalume, F.; Burton, K. A.; Spain, W. J.; McKnight, G. S.; Scheuer, T.; Catterall, W. A. Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nature neuroscience* **2006**, *9*, 1142-1149.
81. Castro, M. J.; Stam, A. H.; Lemos, C.; de Vries, B.; Vanmolkot, K. R.; Barros, J.; Terwindt, G. M.; Frants, R. R.; Sequeiros, J.; Ferrari, M. D.; Pereira-Monteiro, J. M.; van den Maagdenberg, A. M. First mutation in the voltage-gated Nav1.1 subunit gene SCN1A with co-occurring familial hemiplegic migraine and epilepsy. *Cephalalgia* **2009**, *29*, 308-13.
82. Kingston, W. S.; Schwedt, T. J. The Relationship Between Headaches with Epileptic and Non-epileptic Seizures: a Narrative Review. *Current pain and headache reports* **2017**, *21*, 17.
83. Burgess, D. L.; Kohrman, D. C.; Galt, J.; Plummer, N. W.; Jones, J. M.; Spear^o, B.; Meisler, M. H. channel gene, Scn8a, in the mouse mutant "motor endplate. *Nature genetics* **1995**, *10*.
84. Schaller, K. L.; Krzemien, D. M.; Yarowsky, P. J.; Krueger, B. K.; Caldwell, J. H. A novel, abundant sodium channel expressed in neurons and glia. *Journal of Neuroscience* **1995**, *15*, 3231-3242.
85. Plummer, N. W.; Galt, J.; Jones, J. M.; Burgess, D. L.; Sprunger, L. K.; Kohrman, D. C.; Meisler, M. H. Exon organization, coding sequence, physical mapping, and polymorphic intragenic markers for the human neuronal sodium channel gene SCN8A. *Genomics* **1998**, *54*, 287-296.
86. O'brien, J. E.; Drews, V. L.; Jones, J. M.; Dugas, J. C.; Barres, B. A.; Meisler, M. H. Rbfox proteins regulate alternative splicing of neuronal sodium channel SCN8A. *Molecular and Cellular Neuroscience* **2012**, *49*, 120-126.
87. Plummer, N. W.; McBurney, M. W.; Meisler, M. H. Alternative splicing of the sodium channel SCN8A predicts a truncated two-domain protein in fetal brain and non-neuronal cells. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 24008-24015.
88. Lorincz, A.; Nusser, Z. Cell-type-dependent molecular composition of the axon initial segment. *Journal of Neuroscience* **2008**, *28*, 14329-14340.
89. Lorincz, A.; Nusser, Z. Molecular identity of dendritic voltage-gated sodium channels. *Science* **2010**, *328*, 906-909.
90. Schaller, K. L.; Caldwell, J. H. Developmental and regional expression of sodium channel isoform NaCh6 in the rat central nervous system. *Journal of Comparative Neurology* **2000**, *420*, 84-97.
91. Whitaker, W. R.; Faull, R. L.; Waldvogel, H. J.; Plumpton, C. J.; Emson, P. C.; Clare, J. J. Comparative distribution of voltage-gated sodium channel proteins in human brain. *Brain Res Mol Brain Res* **2001**, *88*, 37-53.
92. Boiko, T.; Rasband, M. N.; Levinson, S. R.; Caldwell, J. H.; Mandel, G.; Trimmer, J. S.; Matthews, G. Compact myelin dictates the differential targeting of two sodium channel isoforms in the same axon. *Neuron* **2001**, *30*, 91-104.
93. Van Wart, A.; Matthews, G. Impaired firing and cell-specific compensation in neurons lacking nav1. 6 sodium channels. *Journal of Neuroscience* **2006**, *26*, 7172-7180.
94. Trudeau, M. M.; Dalton, J. C.; Day, J. W.; Ranum, L. P.; Meisler, M. H. Heterozygosity for a protein truncation mutation of sodium channel SCN8A in a patient with cerebellar atrophy, ataxia, and mental retardation. *Journal of medical genetics* **2006**, *43*, 527-530.
95. Rauch, A.; Wiczorek, D.; Graf, E.; Wieland, T.; Endele, S.; Schwarzmayr, T.; Albrecht, B.; Bartholdi, D.; Beygo, J.; Di Donato, N. Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. *The Lancet* **2012**, *380*, 1674-1682.
96. McKinney, B. C.; Chow, C. Y.; Meisler, M. H.; Murphy, G. G. Exaggerated emotional behavior in mice heterozygous null for the sodium channel Scn8a (Nav1. 6). *Genes, Brain and Behavior* **2008**, *7*, 629-638.
97. Papale, L. A.; Beyer, B.; Jones, J. M.; Sharkey, L. M.; Tufik, S.; Epstein, M.; Letts, V. A.; Meisler, M. H.; Frankel, W. N.; Escayg, A. Heterozygous mutations of the voltage-gated sodium channel SCN8A are

- associated with spike-wave discharges and absence epilepsy in mice. *Human molecular genetics* **2009**, *18*, 1633-1641.
98. Fisher, R. S.; Boas, W. v. E.; Blume, W.; Elger, C.; Genton, P.; Lee, P.; Engel, J. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* **2005**, *46*, 470-472.
 99. Berg, A. T.; Berkovic, S. F.; Brodie, M. J.; Buchhalter, J.; Cross, J. H.; van Emde Boas, W.; Engel, J.; French, J.; Glauser, T. A.; Mathern, G. W.; Moshe, S. L.; Nordli, D.; Plouin, P.; Scheffer, I. E. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* **2010**, *51*, 676-85.
 100. Engel, J., Jr. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia* **2001**, *42*, 796-803.
 101. Epilepsy, C. o. C. a. T. o. t. I. L. A. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. From the Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* **1981**, *22*, 489-501.
 102. Epilepsy, C. o. C. a. T. o. t. I. L. A. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia* **1989**, *30*, 389-99.
 103. Katzung, B. G.; Masters, S. B.; Trevor, A. J. *Basic & clinical pharmacology*. Lange Medical Books/McGraw-Hill New York, NY, USA:: 2004; Vol. 8.
 104. Markand, O. N. Slow spike-wave activity in EEG and associated clinical features Often called 'Lennox' or 'Lennox-Gastaut' syndrome. *Neurology* **1977**, *27*, 746-746.
 105. Dravet, C.; Oguni, H. Chapter 65 - Dravet syndrome (severe myoclonic epilepsy in infancy). In *Handbook of Clinical Neurology*, Olivier Dulac, M. L.; Harvey, B. S., Eds. Elsevier: 2013; Vol. Volume 111, pp 627-633.
 106. Dravet, C. Les epilepsies graves de l'enfant. *Vie méd.* **1978**, *8*, 543-548.
 107. Roger, J.; Dravet, C.; Bureau, M.; Dreifuss, F.; Wolf, P. Epileptic Syndromes in Infancy, Childhood and Adolescence. London, Paris: John Libbey Eurotext **1985**.
 108. Claes, L.; Del-Favero, J.; Ceulemans, B.; Lagae, L.; Van Broeckhoven, C.; De Jonghe, P. De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *Am J Hum Genet* **2001**, *68*, 1327-32.
 109. Wu, Y. W.; Sullivan, J.; McDaniel, S. S.; Meisler, M. H.; Walsh, E. M.; Li, S. X.; Kuzniewicz, M. W. Incidence of Dravet Syndrome in a US Population. *Pediatrics* **2015**, *136*, e1310-5.
 110. Brunklaus, A.; Ellis, R.; Reavey, E.; Forbes, G.; Zuberi, S. Prognostic, clinical and demographic features in SCN1A mutation-positive Dravet syndrome. *Brain* **2012**, *aws151*.
 111. Bayat, A.; Hjalgrim, H.; Møller, R. S. The incidence of SCN1A-related Dravet syndrome in Denmark is 1: 22,000: A population-based study from 2004 to 2009. *Epilepsia* **2015**, *56*, e36-e39.
 112. Durá-Travé, T.; Yoldi-Petri, M. E.; Gallinas-Victoriano, F. Epilepsy in children in Navarre, Spain: epileptic seizure types and epileptic syndromes. *Journal of child neurology* **2007**, *22*, 823-828.
 113. Bureau, M.; Bernardina, B. D. Electroencephalographic characteristics of Dravet syndrome. *Epilepsia* **2011**, *52*, 13-23.
 114. McIntosh, A. M.; McMahan, J.; Dibbens, L. M.; Iona, X.; Mulley, J. C.; Scheffer, I. E.; Berkovic, S. F. Effects of vaccination on onset and outcome of Dravet syndrome: a retrospective study. *The Lancet Neurology* **2010**, *9*, 592-598.
 115. Ray, P.; Hayward, J.; Michelson, D.; Lewis, E.; Schwalbe, J.; Black, S.; Shinefield, H.; Marcy, M.; Huff, K.; Ward, J. Encephalopathy after whole-cell pertussis or measles vaccination: lack of evidence for a causal association in a retrospective case-control study. *The Pediatric infectious disease journal* **2006**, *25*, 768-773.
 116. Gataullina, S.; Dulac, O. From genotype to phenotype in Dravet disease. *Seizure* **2016**.

117. Okumura, A.; Uematsu, M.; Imataka, G.; Tanaka, M.; Okanishi, T.; Kubota, T.; Sudo, A.; Tohyama, J.; Tsuji, M.; Ohmori, I. Acute encephalopathy in children with Dravet syndrome. *Epilepsia* **2012**, *53*, 79-86.
118. Nabbout, R.; Chemaly, N.; Chipaux, M.; Barcia, G.; Bouis, C.; Dubouch, C.; Leunen, D.; Jambaqué, I.; Dulac, O.; Dellatolas, G. Encephalopathy in children with Dravet syndrome is not a pure consequence of epilepsy. *Orphanet journal of rare diseases* **2013**, *8*, 176.
119. Gitiaux, C.; Chemaly, N.; Quijano-Roy, S.; Barnerias, C.; Desguerre, I.; Hully, M.; Chiron, C.; Dulac, O.; Nabbout, R. Motor neuropathy contributes to crouching in patients with Dravet syndrome. *Neurology* **2016**, *87*, 277-281.
120. Battaglia, D.; Chieffo, D.; Siracusano, R.; de Waure, C.; Brogna, C.; Ranalli, D.; Contaldo, I.; Tortorella, G.; Dravet, C.; Mercuri, E. Cognitive decline in Dravet syndrome: is there a cerebellar role? *Epilepsy research* **2013**, *106*, 211-221.
121. Villeneuve, N.; Laguitton, V.; Viellard, M.; Lépine, A.; Chabrol, B.; Dravet, C.; Milh, M. Cognitive and adaptive evaluation of 21 consecutive patients with Dravet syndrome. *Epilepsy & behavior* **2014**, *31*, 143-148.
122. Catarino, C. B.; Liu, J. Y.; Liagkouras, I.; Gibbons, V. S.; Labrum, R. W.; Ellis, R.; Woodward, C.; Davis, M. B.; Smith, S. J.; Cross, J. H. Dravet syndrome as epileptic encephalopathy: evidence from long-term course and neuropathology. *Brain* **2011**, awr129.
123. Connolly, M. B. Dravet Syndrome: Diagnosis and Long-Term Course. *Canadian Journal of Neurological Sciences/Journal Canadien des Sciences Neurologiques* **2016**, *43*, S3-S8.
124. Akiyama, M.; Kobayashi, K.; Yoshinaga, H.; Ohtsuka, Y. A long-term follow-up study of Dravet syndrome up to adulthood. *Epilepsia* **2010**, *51*, 1043-1052.
125. Genton, P.; Velizarova, R.; Dravet, C. Dravet syndrome: The long-term outcome. *Epilepsia* **2011**, *52*, 44-49.
126. Cooper, M. S.; Mcintosh, A.; Crompton, D. E.; McMahan, J. M.; Schneider, A.; Farrell, K.; Ganesan, V.; Gill, D.; Kivity, S.; Lerman-Sagie, T. Mortality in Dravet syndrome. *Epilepsy Research* **2016**, *128*, 43-47.
127. Skluzacek, J. V.; Watts, K. P.; Parsy, O.; Wical, B.; Camfield, P. Dravet syndrome and parent associations: the IDEA League experience with comorbid conditions, mortality, management, adaptation, and grief. *Epilepsia* **2011**, *52*, 95-101.
128. Moulard, B.; Chaigne, D.; Mouthon, D.; Buresi, C.; Guipponi, M.; Malafosse, A. Identification of a new locus for generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+) on chromosome 2q24-q33. *The American Journal of Human Genetics* **1999**, *65*, 1396-1400.
129. Baulac, S.; Gourfinkel-An, I.; Picard, F.; Rosenberg-Bourgin, M.; Prud'homme, J.-F.; Baulac, M.; Brice, A.; LeGuern, E. A second locus for familial generalized epilepsy with febrile seizures plus maps to chromosome 2q21-q33. *The American Journal of Human Genetics* **1999**, *65*, 1078-1085.
130. Escayg, A.; MacDonald, B. T.; Meisler, M. H.; Baulac, S.; Huberfeld, G.; An-Gourfinkel, I.; Brice, A.; LeGuern, E.; Moulard, B.; Chaigne, D. Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+ 2. *Nature genetics* **2000**, *24*, 343-345.
131. Depienne, C.; Trouillard, O.; Saint-Martin, C.; Isabelle, A.; Bouteiller, D.; Carpentier, W.; Keren, B.; Abert, B.; Gautier, A.; Baulac, S. Spectrum of SCN1A gene mutations associated with Dravet syndrome: analysis of 333 patients. *Journal of medical genetics* **2008**.
132. Ceulemans, B. P.; Claes, L. R.; Lagae, L. G. Clinical correlations of mutations in the SCN1A gene: from febrile seizures to severe myoclonic epilepsy in infancy. *Pediatric neurology* **2004**, *30*, 236-243.
133. Roach, J. C.; Glusman, G.; Smit, A. F.; Huff, C. D.; Hubley, R.; Shannon, P. T.; Rowen, L.; Pant, K. P.; Goodman, N.; Bamshad, M. Analysis of genetic inheritance in a family quartet by whole-genome sequencing. *Science* **2010**, *328*, 636-639.

134. Lynch, M. Rate, molecular spectrum, and consequences of human mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, 107, 961-968.
135. Vadlamudi, L.; Dibbens, L. M.; Lawrence, K. M.; Iona, X.; McMahon, J. M.; Murrell, W.; Mackay-Sim, A.; Scheffer, I. E.; Berkovic, S. F. Timing of de novo mutagenesis—a twin study of sodium-channel mutations. *New England Journal of Medicine* **2010**, 363, 1335-1340.
136. Taylor, J.; Tyekucheva, S.; Zody, M.; Chiaromonte, F.; Makova, K. D. Strong and weak male mutation bias at different sites in the primate genomes: insights from the human-chimpanzee comparison. *Molecular biology and evolution* **2006**, 23, 565-573.
137. Bohossian, H. B.; Skaletsky, H.; Page, D. C. Unexpectedly similar rates of nucleotide substitution found in male and female hominids. *Nature* **2000**, 406, 622-625.
138. Claes, L.; Ceulemans, B.; Audenaert, D.; Smets, K.; Lofgren, A.; Del-Favero, J.; Ala-Mello, S.; Basel-Vanagaite, L.; Plecko, B.; Raskin, S.; Thiry, P.; Wolf, N. I.; Van Broeckhoven, C.; De Jonghe, P. De novo SCN1A mutations are a major cause of severe myoclonic epilepsy of infancy. *Hum Mutat* **2003**, 21, 615-21.
139. Meisler, M. H.; Kearney, J. A. Sodium channel mutations in epilepsy and other neurological disorders. *The Journal of clinical investigation* **2005**, 115, 2010-2017.
140. Harkin, L. A.; McMahon, J. M.; Iona, X.; Dibbens, L.; Pelekanos, J. T.; Zuberi, S. M.; Sadleir, L. G.; Andermann, E.; Gill, D.; Farrell, K. The spectrum of SCN1A-related infantile epileptic encephalopathies. *Brain* **2007**, 130, 843-852.
141. Misra, S. N.; Kahlig, K. M.; George, A. L., Jr. Impaired NaV1.2 function and reduced cell surface expression in benign familial neonatal-infantile seizures. *Epilepsia* **2008**, 49, 1535-45.
142. Catterall, W. A.; Dib-Hajj, S.; Meisler, M. H.; Pietrobon, D. Inherited neuronal ion channelopathies: new windows on complex neurological diseases. *Journal of Neuroscience* **2008**, 28, 11768-11777.
143. Kearney, J.; Meisler, M. Single gene mutations in inherited and sporadic epilepsy. *Encyclopedia of Basic Epilepsy Research* **2009**.
144. Madia, F.; Striano, P.; Gennaro, E.; Malacarne, M.; Paravidino, R.; Biancheri, R.; Budetta, M.; Cilio, M.; Gaggero, R.; Pierluigi, M. Cryptic chromosome deletions involving SCN1A in severe myoclonic epilepsy of infancy. *Neurology* **2006**, 67, 1230-1235.
145. Marini, C.; Scheffer, I. E.; Nabbout, R.; Mei, D.; Cox, K.; Dibbens, L. M.; McMahon, J. M.; Iona, X.; Carpintero, R. S.; Elia, M.; Cilio, M. R.; Specchio, N.; Giordano, L.; Striano, P.; Gennaro, E.; Cross, J. H.; Kivity, S.; Neufeld, M. Y.; Afawi, Z.; Andermann, E.; Keene, D.; Dulac, O.; Zara, F.; Berkovic, S. F.; Guerrini, R.; Mulley, J. C. SCN1A duplications and deletions detected in Dravet syndrome: implications for molecular diagnosis. *Epilepsia* **2009**, 50, 1670-8.
146. Pereira, S.; Vieira, J.; Barroca, F.; Roll, P.; Carvalhas, R.; Cau, P.; Sequeira, S.; Genton, P.; Szepetowski, P. Severe epilepsy, retardation, and dysmorphic features with a 2q deletion including SCN1A and SCN2A. *Neurology* **2004**, 63, 191-192.
147. Suls, A.; Claeys, K. G.; Goossens, D.; Harding, B.; Luijk, R. V.; Scheers, S.; Deprez, L.; Audenaert, D.; Dyck, T. V.; Beeckmans, S. Microdeletions involving the SCN1A gene may be common in SCN1A-mutation-negative SMEI patients. *Human mutation* **2006**, 27, 914-920.
148. Nassar, M. A.; Baker, M. D.; Levato, A.; Ingram, R.; Mallucci, G.; McMahon, S. B.; Wood, J. N. Nerve injury induces robust allodynia and ectopic discharges in Na v 1.3 null mutant mice. *Molecular pain* **2006**, 2, 33.
149. Nassar, M. A.; Stirling, L. C.; Forlani, G.; Baker, M. D.; Matthews, E. A.; Dickenson, A. H.; Wood, J. N. Nociceptor-specific gene deletion reveals a major role for Nav1. 7 (PN1) in acute and inflammatory pain. *Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, 101, 12706-12711.

150. Planells-Cases, R.; Caprini, M.; Zhang, J.; Rockenstein, E.; Rivera, R.; Murre, C.; Masliah, E.; Montal, M. Neuronal death and perinatal lethality in voltage-gated sodium channel α II-deficient mice. *Biophysical journal* **2000**, *78*, 2878-2891.
151. Depienne, C.; Trouillard, O.; Gourfinkel-An, I.; Saint-Martin, C.; Bouteiller, D.; Graber, D.; Barthez-Carpentier, M.-A.; Gautier, A.; Villeneuve, N.; Dravet, C. Mechanisms for variable expressivity of inherited SCN1A mutations causing Dravet syndrome. *Journal of medical genetics* **2010**, *47*, 404-410.
152. Cartegni, L.; Chew, S. L.; Krainer, A. R. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nature Reviews Genetics* **2002**, *3*, 285-298.
153. Chen, Y.; Yu, F. H.; Sharp, E. M.; Beacham, D.; Scheuer, T.; Catterall, W. A. Functional properties and differential neuromodulation of Na(v)1.6 channels. *Mol Cell Neurosci* **2008**, *38*, 607-15.
154. Kole, M. H.; Ilschner, S. U.; Kampa, B. M.; Williams, S. R.; Ruben, P. C.; Stuart, G. J. Action potential generation requires a high sodium channel density in the axon initial segment. *Nature neuroscience* **2008**, *11*, 178-186.
155. Royeck, M.; Horstmann, M.-T.; Remy, S.; Reitze, M.; Yaari, Y.; Beck, H. Role of axonal NaV1.6 sodium channels in action potential initiation of CA1 pyramidal neurons. *Journal of neurophysiology* **2008**, *100*, 2361-2380.
156. Martin, M. S.; Tang, B.; Papale, L. A.; Yu, F. H.; Catterall, W. A.; Escayg, A. The voltage-gated sodium channel Scn8a is a genetic modifier of severe myoclonic epilepsy of infancy. *Hum Mol Genet* **2007**, *16*, 2892-9.
157. Brunklaus, A.; Ellis, R.; Stewart, H.; Aylett, S.; Reavey, E.; Jefferson, R.; Jain, R.; Chakraborty, S.; Jayawant, S.; Zuberi, S. M. Homozygous mutations in the SCN1A gene associated with genetic epilepsy with febrile seizures plus and Dravet syndrome in 2 families. *Eur J Paediatr Neurol* **2015**, *19*, 484-8.
158. Suls, A.; Jaehn, J. A.; Kecskés, A.; Weber, Y.; Weckhuysen, S.; Craiu, D. C.; Siekierska, A.; Djémié, T.; Afrikanova, T.; Gormley, P. De novo loss-of-function mutations in CHD2 cause a fever-sensitive myoclonic epileptic encephalopathy sharing features with Dravet syndrome. *The American Journal of Human Genetics* **2013**, *93*, 967-975.
159. Carvill, G. L.; Weckhuysen, S.; McMahon, J. M.; Hartmann, C.; Møller, R. S.; Hjalgrim, H.; Cook, J.; Geraghty, E.; O'Roak, B. J.; Petrou, S. GABRA1 and STXBP1: novel genetic causes of Dravet syndrome. *Neurology* **2014**, *82*, 1245-1253.
160. Depienne, C.; Bouteiller, D.; Keren, B.; Cheuret, E.; Poirier, K.; Trouillard, O.; Benyahia, B.; Quelin, C.; Carpentier, W.; Julia, S. Sporadic infantile epileptic encephalopathy caused by mutations in PCDH19 resembles Dravet syndrome but mainly affects females. *PLoS Genet* **2009**, *5*, e1000381.
161. Shi, X.; Yasumoto, S.; Kurahashi, H.; Nakagawa, E.; Fukasawa, T.; Uchiya, S.; Hirose, S. Clinical spectrum of SCN2A mutations. *Brain and Development* **2012**, *34*, 541-545.
162. Mulley, J. C.; Hodgson, B.; McMahon, J. M.; Iona, X.; Bellows, S.; Mullen, S. A.; Farrell, K.; Mackay, M.; Sadleir, L.; Bleasel, A. Role of the sodium channel SCN9A in genetic epilepsy with febrile seizures plus and Dravet syndrome. *Epilepsia* **2013**, *54*, e122-e126.
163. Ohmori, I.; Ouchida, M.; Kobayashi, K.; Jitsumori, Y.; Mori, A.; Michiue, H.; Nishiki, T.; Ohtsuka, Y.; Matsui, H. CACNA1A variants may modify the epileptic phenotype of Dravet syndrome. *Neurobiology of disease* **2013**, *50*, 209-217.
164. Djémié, T.; Weckhuysen, S.; von Spiczak, S.; Carvill, G. L.; Jaehn, J.; Anttonen, A.-K.; Brilstra, E.; Caglayan, H. S.; de Kovel, C. G.; Depienne, C.; Gaily, E.; Gennaro, E.; Giraldez, B. G.; Gormley, P.; Guerrero-López, R.; Guerrini, R.; Hämäläinen, E.; Hartmann, C.; Hernandez-Hernandez, L.; Hjalgrim, H.; Koeleman, B. P. C.; Leguern, E.; Lehesjoki, A.-E.; Lemke, J. R.; Leu, C.; Marini, C.; McMahon, J. M.; Mei, D.; Møller, R. S.; Muhle, H.; Myers, C. T.; Nava, C.; Serratosa, J. M.; Sisodiya, S. M.; Stephani, U.; Striano, P.; van Kempen, M. J. A.; Verbeek, N. E.; Usluer, S.; Zara, F.; Palotie, A.; Mefford, H. C.; Scheffer, I. E.; De Jonghe, P.; Helbig, I.; Suls,

- A.; Euro, E.-R. E. S. D. w. g. Pitfalls in genetic testing: the story of missed SCN1A mutations. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* **2016**, n/a-n/a.
165. Ogiwara, I.; Miyamoto, H.; Morita, N.; Atapour, N.; Mazaki, E.; Inoue, I.; Takeuchi, T.; Itohara, S.; Yanagawa, Y.; Obata, K.; Furuichi, T.; Hensch, T. K.; Yamakawa, K. Nav1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an Scn1a gene mutation. *J Neurosci* **2007**, *27*, 5903-14.
 166. Higurashi, N.; Uchida, T.; Lossin, C.; Misumi, Y.; Okada, Y.; Akamatsu, W.; Imaizumi, Y.; Zhang, B.; Nabeshima, K.; Mori, M. X. A human Dravet syndrome model from patient induced pluripotent stem cells. *Molecular brain* **2013**, *6*, 19.
 167. Chopra, R.; Isom, L. L. Untangling the dravet syndrome seizure network: the changing face of a rare genetic epilepsy. *Epilepsy Currents* **2014**, *14*, 86-89.
 168. Liu, Y.; Lopez-Santiago, L. F.; Yuan, Y.; Jones, J. M.; Zhang, H.; O'malley, H. A.; Patino, G. A.; O'brien, J. E.; Rusconi, R.; Gupta, A. Dravet syndrome patient-derived neurons suggest a novel epilepsy mechanism. *Annals of neurology* **2013**, *74*, 128-139.
 169. Sarao, R.; Gupta, S. K.; Auld, V. J.; Dunn, R. J. Developmentally regulated alternative RNA splicing of rat brain sodium channel mRNAs. *Nucleic acids research* **1991**, *19*, 5673-5679.
 170. Whitaker, W. R.; Clare, J. J.; Powell, A. J.; Chen, Y. H.; Faull, R. L.; Emson, P. C. Distribution of voltage-gated sodium channel alpha-subunit and beta-subunit mRNAs in human hippocampal formation, cortex, and cerebellum. *J Comp Neurol* **2000**, *422*, 123-39.
 171. Ben-Ari, Y.; Holmes, G. L. Effects of seizures on developmental processes in the immature brain. *The Lancet Neurology* **2006**, *5*, 1055-1063.
 172. Haut, S. R.; Veliškova, J.; Moshé, S. L. Susceptibility of immature and adult brains to seizure effects. *The Lancet Neurology* **2004**, *3*, 608-617.
 173. Kalume, F.; Oakley, J. C.; Westenbroek, R. E.; Gile, J.; Horacio, O.; Scheuer, T.; Catterall, W. A. Sleep impairment and reduced interneuron excitability in a mouse model of Dravet Syndrome. *Neurobiology of disease* **2015**, *77*, 141-154.
 174. Wagner, S.; Yarom, Y. Excitation by GABA in the SCN reaches its time and place (Commentary on Irwin & Allen). *European Journal of Neuroscience* **2009**, *30*, 1461-1461.
 175. Kang, J.-Q.; Shen, W.; Macdonald, R. L. Why does fever trigger febrile seizures? GABAA receptor $\gamma 2$ subunit mutations associated with idiopathic generalized epilepsies have temperature-dependent trafficking deficiencies. *Journal of Neuroscience* **2006**, *26*, 2590-2597.
 176. Kalume, F. Sudden unexpected death in Dravet syndrome: respiratory and other physiological dysfunctions. *Respiratory physiology & neurobiology* **2013**, *189*, 324-328.
 177. Duflocq, A.; Le Bras, B.; Bullier, E.; Couraud, F.; Davenne, M. Nav1. 1 is predominantly expressed in nodes of Ranvier and axon initial segments. *Molecular and Cellular Neuroscience* **2008**, *39*, 180-192.
 178. Catterall, W. A. Sodium channel mutations and epilepsy. **2012**.
 179. Kalume, F.; Frank, H. Y.; Westenbroek, R. E.; Scheuer, T.; Catterall, W. A. Reduced sodium current in Purkinje neurons from Nav1. 1 mutant mice: implications for ataxia in severe myoclonic epilepsy in infancy. *Journal of Neuroscience* **2007**, *27*, 11065-11074.
 180. Raman, I. M.; Bean, B. P. Resurgent sodium current and action potential formation in dissociated cerebellar Purkinje neurons. *Journal of Neuroscience* **1997**, *17*, 4517-4526.
 181. Schmahmann, J. D. Disorders of the cerebellum: ataxia, dysmetria of thought, and the cerebellar cognitive affective syndrome. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* **2004**, *16*, 367-378.
 182. Fountain-Capal, J. K.; Holland, K. D.; Gilbert, D. L.; Hallinan, B. E. When should clinicians order genetic testing for Dravet syndrome? *Pediatric neurology* **2011**, *45*, 319-323.

183. Löscher, W. Preclinical assessment of proconvulsant drug activity and its relevance for predicting adverse events in humans. *European journal of pharmacology* **2009**, 610, 1-11.
184. Wirrell, E. C.; Laux, L.; Franz, D. N.; Sullivan, J.; Saneto, R. P.; Morse, R. P.; Devinsky, O.; Chugani, H.; Hernandez, A.; Hamiwka, L. Stiripentol in Dravet syndrome: results of a retrospective US study. *Epilepsia* **2013**, 54, 1595-1604.
185. Aras, L. M.; Isla, J.; Mingorance-Le Meur, A. The European patient with Dravet syndrome: results from a parent-reported survey on antiepileptic drug use in the European population with Dravet syndrome. *Epilepsy Behav* **2015**, 44, 104-9.
186. Fisher, J. L. Interactions between modulators of the GABA A receptor: stiripentol and benzodiazepines. *European journal of pharmacology* **2011**, 654, 160-165.
187. Schoonjans, A.; Paelinck, B.; Marchau, F.; Gunning, B.; Gammaitoni, A.; Galer, B.; Lagae, L.; Ceulemans, B. Low-dose fenfluramine significantly reduces seizure frequency in Dravet syndrome: a prospective study of a new cohort of patients. *European journal of neurology* **2017**, 24, 309-314.
188. Ceulemans, B.; Schoonjans, A. S.; Marchau, F.; Paelinck, B. P.; Lagae, L. Five-year extended follow-up status of 10 patients with Dravet syndrome treated with fenfluramine. *Epilepsia* **2016**, 57, e129-e134.
189. O'Connell, B. K.; Gloss, D.; Devinsk, O. Cannabinoids in treatment-resistant epilepsy: A review. *Epilepsy & Behavior* **2017**.
190. Rubio, M.; Valdeolivas, S.; Piscitelli, F.; Verde, R.; Satta, V.; Barroso, E.; Montolio, M.; Aras, L. M.; Di Marzo, V.; Sagredo, O. Analysis of endocannabinoid signaling elements and related proteins in lymphocytes of patients with Dravet syndrome. *Pharmacology research & perspectives* **2016**, 4.
191. Thompson, C. H.; Porter, J. C.; Kahlig, K. M.; Daniels, M. A.; George, A. L., Jr. Nontruncating SCN1A mutations associated with severe myoclonic epilepsy of infancy impair cell surface expression. *J Biol Chem* **2012**, 287, 42001-8.
192. Raman, I. M.; Bean, B. P. Resurgent sodium current and action potential formation in dissociated cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci* **1997**, 17, 4517-26.
193. Oakley, J. C.; Kalume, F.; Frank, H. Y.; Scheuer, T.; Catterall, W. A. Temperature- and age-dependent seizures in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, 106, 3994-3999.
194. Norman, P. Repurposing as a strategy for orphan drug development, evidence from European approvals. *Expert Opinion on Orphan Drugs* **2013**, 1, 473-480.
195. Oliveira, J. S.; Redaelli, E.; Zaharenko, A. J.; Cassulini, R. R.; Konno, K.; Pimenta, D. C.; Freitas, J. C.; Clare, J. J.; Wanke, E. Binding specificity of sea anemone toxins to Nav 1.1-1.6 sodium channels: unexpected contributions from differences in the IV/S3-S4 outer loop. *J Biol Chem* **2004**, 279, 33323-35.
196. Krafte, D. S.; Volberg, W. A.; Rapp, L.; Kallen, R. G.; Lalik, P. H.; Ciccarelli, R. B. Stable expression and functional characterization of a human cardiac Na⁺ channel gene in mammalian cells. *J Mol Cell Cardiol* **1995**, 27, 823-30.
197. Lalik, P. H.; Krafte, D. S.; Volberg, W. A.; Ciccarelli, R. B. Characterization of endogenous sodium channel gene expressed in Chinese hamster ovary cells. *Am J Physiol* **1993**, 264, C803-9.
198. Molokanova, E.; Savchenko, A. Bright future of optical assays for ion channel drug discovery. *Drug Discov Today* **2008**, 13, 14-22.
199. Zheng, W.; Spencer, R. H.; Kiss, L. High throughput assay technologies for ion channel drug discovery. *Assay Drug Dev Technol* **2004**, 2, 543-52.
200. Baxter, D. F.; Kirk, M.; Garcia, A. F.; Raimondi, A.; Holmqvist, M. H.; Flint, K. K.; Bojanic, D.; Distefano, P. S.; Curtis, R.; Xie, Y. A novel membrane potential-sensitive fluorescent dye improves cell-based assays for ion channels. *J Biomol Screen* **2002**, 7, 79-85.

201. Benjamin, E. R.; Pruthi, F.; Olanrewaju, S.; Ilyin, V. I.; Crumley, G.; Kutlina, E.; Valenzano, K. J.; Woodward, R. M. State-dependent compound inhibition of Nav1.2 sodium channels using the FLIPR Vm dye: on-target and off-target effects of diverse pharmacological agents. *J Biomol Screen* **2006**, *11*, 29-39.
202. Hamill, O. P.; Marty, A.; Neher, E.; Sakmann, B.; Sigworth, F. J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* **1981**, *391*, 85-100.
203. Neher, E.; Sakmann, B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **1976**, *260*, 799-802.
204. Neher, E.; Sakmann, B.; Steinbach, J. H. The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflugers Arch* **1978**, *375*, 219-28.
205. Hodgkin, A. L.; Huxley, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* **1952**, *117*, 500-44.
206. Hodgkin, A. L.; Huxley, A. F. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* **1952**, *116*, 449-72.
207. Hodgkin, A. L.; Huxley, A. F. The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* **1952**, *116*, 473-96.
208. Hodgkin, A. L.; Huxley, A. F.; Katz, B. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* **1952**, *116*, 424-48.
209. Curtis, H. J.; Cole, K. S. Transverse electric impedance of the squid giant axon. *J Gen Physiol* **1938**, *21*, 757-65.
210. Zhang, J. H. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *Journal of Biomolecular Screening* **1999**, *4*, 67-73.
211. Catterall, W. A. Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **1980**, *20*, 15-43.
212. Sinatra, R. S.; Jahr, J. S.; Watkins-Pitchford, J. M. *The essence of analgesia and analgesics*. Cambridge University Press: 2010.
213. Ragsdale, D.; McPhee, J.; Scheuer, T.; Catterall, W. Molecular determinants of state-dependent block of Na⁺ channels by local anesthetics. *Science* **1994**, *265*, 1724-1728.
214. Bean, B. P.; Cohen, C. J.; Tsien, R. W. Lidocaine block of cardiac sodium channels. *J Gen Physiol* **1983**, *81*, 613-42.
215. Bellet, S.; Roman, L.; Kostis, J. B.; Fleischmann, D. Intramuscular lidocaine in the therapy of ventricular arrhythmias. *Am J Cardiol* **1971**, *27*, 291-3.
216. Gianelly, R.; von der Groeben, J. O.; Spivack, A. P.; Harrison, D. C. Effect of lidocaine on ventricular arrhythmias in patients with coronary heart disease. *N Engl J Med* **1967**, *277*, 1215-9.
217. Hille, B. *Local anesthetic action on inactivation of the Na channel in nerve and skeletal muscle. Biophysical Aspects of Cardiac Muscle*. Academic Press: New York, 1978.
218. Schmidt-mayer, J.; Ulbricht, W. Interaction of lidocaine and benzocaine in blocking sodium channels. *Pflugers Arch* **1980**, *387*, 47-54.
219. Miyazawa, K.; Noguchi, T. Distribution and origin of tetrodotoxin. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews* **2001**, *20*, 11-33.
220. Patockaa, J.; Stredab, L. Brief review of natural nonprotein neurotoxins. *ASA newsletter* **2002**, *89*, 16-24.
221. Narahashi, T.; Moore, J. W.; Scott, W. R. Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axons. *J Gen Physiol* **1964**, *47*, 965-74.
222. Khodorov, B. I. Batrachotoxin as a tool to study voltage-sensitive sodium channels of excitable membranes. *Prog Biophys Mol Biol* **1985**, *45*, 57-148.

223. Reilly, S. M.; Chiang, S.-H.; Decker, S. J.; Chang, L.; Uhm, M.; Larsen, M. J.; Rubin, J. R.; Mowers, J.; White, N. M.; Hochberg, I. An inhibitor of the protein kinases TBK1 and IKK-[ϵ]- improves obesity-related metabolic dysfunctions in mice. *Nature medicine* **2013**, *19*, 313-321.
224. Makino, H.; Saijo, T.; Ashida, Y.; Kuriki, H.; Maki, Y. Mechanism of action of an antiallergic agent, Amlexanox (AA-673), in inhibiting histamine release from mast cells. *International Archives of Allergy and Immunology* **1987**, *82*, 66-71.
225. Okada, m.; hatakeyama, t.; tokumitsu, h.; kobayashi, r. Hsp90 is a direct target of the anti-allergic drugs disodium cromoglycate and amlexanox. *Biochemical Journal* **2003**, *374*, 433-441.
226. A Loudon, J. Repurposing Amlexanox as a Run the Red Light Cure-All with Readthrough a No-Nonsense Approach to Personalised Medicine. *Journal of Bioanalysis & Biomedicine* **2013**, *05*.
227. Collard, J.; Sherman, O. K.; Hsiao, J. H. Treatment of diseases related to alpha subunits of sodium channels, voltage-gated (scnxa) with small molecules. In Google Patents: 2012.
228. Vijayapandi, P.; Harisankar, S.; Nancy, J. Depression-like effect of telmisartan in mice forced swim test: involvement of brain monoaminergic system. *J Pharmacol Toxicol* **2012**, *7*, 87-95.
229. Wright, J. W.; Harding, J. W. Brain renin-angiotensin—a new look at an old system. *Progress in neurobiology* **2011**, *95*, 49-67.
230. Hosseini, M.; Alaei, H.; Sharifi, M. R.; Shafeia, M. The Effects of Angiotensin II and Captopril on Expression of Morphine Withdrawal Signs in Rat. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* **2010**, 185-191.
231. Xing, J.; Lu, J.; Li, J. Angiotensin II inhibits GABAergic synaptic transmission in dorsolateral periaqueductal gray neurons. *Neuroscience letters* **2009**, 455, 8-13.
232. Pushpa, V.; Shetty, P.; Suresha, R.; Jayanthi, M.; Ashwini, V.; Vaibhavi, P. Evaluation and comparison of anticonvulsant activity of telmisartan and olmesartan in experimentally induced animal models of epilepsy. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR* **2014**, *8*, HC08.
233. Łukawski, K.; Janowska, A.; Jakubus, T.; Tochman-Gawda, A.; Czuczwar, S. J. Angiotensin AT 1 receptor antagonists enhance the anticonvulsant action of valproate in the mouse model of maximal electroshock. *European journal of pharmacology* **2010**, *640*, 172-177.
234. Kalra, J.; Prakash, A.; Kumar, P.; Majeed, A. B. A. Cerebroprotective effects of RAS inhibitors: Beyond their cardio-renal actions. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System* **2015**, *16*, 459-468.
235. Pechlivanova, D. M.; Stoynev, A. G.; Tchekalarova, J. D. The effects of chronic losartan pretreatment on restraint stress-induced changes in motor activity, nociception and pentylenetetrazol generalized seizures in rats. *Folia medica* **2011**, *53*, 69-73.
236. Khan, M.; Melmon, K.; Marr-Leisy, D.; Verlander, M.; Egli, M.; Lok, S.; Goodman, M. Congener derivatives and conjugates of histamine: synthesis and tissue and receptor selectivity of the derivatives. *Journal of medicinal chemistry* **1987**, *30*, 2115-2120.
237. Shahid, M.; Tripathi, T.; Sobia, F.; Moin, S.; Siddiqui, M.; Khan, R. A. Histamine, histamine receptors, and their role in immunomodulation: an updated systematic review. *The Open Immunology Journal* **2009**, *2*.
238. Noda, M.; Ikeda, T.; Suzuki, H.; Takeshima, H.; Takahashi, T.; Kuno, M.; Numa, S. Expression of functional sodium channels from cloned cDNA. *Nature* **1986**, *322*, 826-828.
239. Auld, V. J.; Goldin, A. L.; Krafte, D. S.; Marshall, J.; Dunn, J. M.; Catterall, W. A.; Lester, H. A.; Davidson, N.; Dunn, R. J. A rat brain Na⁺ channel α subunit with novel gating properties. *Neuron* **1988**, *1*, 449-461.
240. West, J. W.; Scheuer, T.; Maechler, L.; Catterall, W. A. Efficient expression of rat brain type IIA Na⁺ channel alpha subunits in a somatic cell line. *Neuron* **1992**, *8*, 59-70.
241. Ma, J. Y.; Catterall, W. A.; Scheuer, T. Persistent sodium currents through brain sodium channels induced by G protein betagamma subunits. *Neuron* **1997**, *19*, 443-52.

242. Mantegazza, M.; Yu, F. H.; Powell, A. J.; Clare, J. J.; Catterall, W. A.; Scheuer, T. Molecular determinants for modulation of persistent sodium current by G-protein betagamma subunits. *J Neurosci* **2005**, *25*, 3341-9.
243. Qu, Y.; Curtis, R.; Lawson, D.; Gilbride, K.; Ge, P.; DiStefano, P. S.; Silos-Santiago, I.; Catterall, W. A.; Scheuer, T. Differential modulation of sodium channel gating and persistent sodium currents by the beta1, beta2, and beta3 subunits. *Mol Cell Neurosci* **2001**, *18*, 570-80.
244. Chen, Y. H.; Dale, T. J.; Romanos, M. A.; Whitaker, W. R.; Xie, X. M.; Clare, J. J. Cloning, distribution and functional analysis of the type III sodium channel from human brain. *Eur J Neurosci* **2000**, *12*, 4281-9.
245. Isom, L. L.; Scheuer, T.; Brownstein, A. B.; Ragsdale, D. S.; Murphy, B. J.; Catterall, W. A. Functional co-expression of the beta 1 and type IIA alpha subunits of sodium channels in a mammalian cell line. *J Biol Chem* **1995**, *270*, 3306-12.
246. Mitrović, N.; George Jr, A.; Heine, R.; Wagner, S.; Pika, U.; Hartlaub, U.; Zhou, M.; Lerche, H.; Fahlke, C.; Lehmann-Horn, F. K (+)-aggravated myotonia: destabilization of the inactivated state of the human muscle Na⁺ channel by the V1589M mutation. *The Journal of physiology* **1994**, *478*, 395.
247. Trimmer, J. S.; Rhodes, K. J. Localization of voltage-gated ion channels in mammalian brain. *Annu Rev Physiol* **2004**, *66*, 477-519.
248. Sharkey, L. M.; Cheng, X.; Drews, V.; Buchner, D. A.; Jones, J. M.; Justice, M. J.; Waxman, S. G.; Dib-Hajj, S. D.; Meisler, M. H. The ataxia3 mutation in the N-terminal cytoplasmic domain of sodium channel Nav1. 6 disrupts intracellular trafficking. *Journal of Neuroscience* **2009**, *29*, 2733-2741.
249. Lossin, C.; Rhodes, T. H.; Desai, R. R.; Vanoye, C. G.; Wang, D.; Carniciu, S.; Devinsky, O.; George, A. L., Jr. Epilepsy-associated dysfunction in the voltage-gated neuronal sodium channel SCN1A. *J Neurosci* **2003**, *23*, 11289-95.
250. Mantegazza, M.; Gambardella, A.; Rusconi, R.; Schiavon, E.; Annesi, F.; Cassulini, R. R.; Labate, A.; Carrideo, S.; Chifari, R.; Canevini, M. P.; Canger, R.; Franceschetti, S.; Annesi, G.; Wanke, E.; Quattrone, A. Identification of an Nav1.1 sodium channel (SCN1A) loss-of-function mutation associated with familial simple febrile seizures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, 18177-82.
251. Ohmori, I.; Kahlig, K. M.; Rhodes, T. H.; Wang, D. W.; George, A. L., Jr. Nonfunctional SCN1A is common in severe myoclonic epilepsy of infancy. *Epilepsia* **2006**, *47*, 1636-42.
252. Vanoye, C. G.; Lossin, C.; Rhodes, T. H.; George, A. L., Jr. Single-channel properties of human Nav1.1 and mechanism of channel dysfunction in SCN1A-associated epilepsy. *J Gen Physiol* **2006**, *127*, 1-14.
253. Burbidge, S. A.; Dale, T. J.; Powell, A. J.; Whitaker, W. R.; Xie, X. M.; Romanos, M. A.; Clare, J. J. Molecular cloning, distribution and functional analysis of the NA(V)1.6. Voltage-gated sodium channel from human brain. *Brain Res Mol Brain Res* **2002**, *103*, 80-90.
254. Sharkey, L. M.; Cheng, X.; Drews, V.; Buchner, D. A.; Jones, J. M.; Justice, M. J.; Waxman, S. G.; Dib-Hajj, S. D.; Meisler, M. H. The ataxia3 mutation in the N-terminal cytoplasmic domain of sodium channel Na(v)1.6 disrupts intracellular trafficking. *J Neurosci* **2009**, *29*, 2733-41.
255. Veeramah, K. R.; O'Brien, J. E.; Meisler, M. H.; Cheng, X.; Dib-Hajj, S. D.; Waxman, S. G.; Talwar, D.; Girirajan, S.; Eichler, E. E.; Restifo, L. L.; Erickson, R. P.; Hammer, M. F. De novo pathogenic SCN8A mutation identified by whole-genome sequencing of a family quartet affected by infantile epileptic encephalopathy and SUDEP. *Am J Hum Genet* **2012**, *90*, 502-10.
256. Zhang, Y.; Kecskés, A.; Copmans, D.; Langlois, M.; Crawford, A. D.; Ceulemans, B.; Lagae, L.; de Witte, P. A.; Esguerra, C. V. Pharmacological characterization of an antisense knockdown zebrafish model of Dravet syndrome: inhibition of epileptic seizures by the serotonin agonist fenfluramine. *PLoS one* **2015**, *10*, e0125898.

257. Gontika, M. P.; Konialis, C.; Pangalos, C.; Papavasiliou, A. Novel SCN1A and GABRA1 Gene Mutations With Diverse Phenotypic Features and the Question on the Existence of a Broader Spectrum of Dravet Syndrome. *Child Neurology Open* **2017**, *4*, 2329048X17706794.
258. Castle, N.; Printzenhoff, D.; Zellmer, S.; Antonio, B.; Wickenden, A.; Silvia, C. Sodium channel inhibitor drug discovery using automated high throughput electrophysiology platforms. *Combinatorial chemistry & high throughput screening* **2009**, *12*, 107-122.
259. Dunlop, J.; Bowlby, M.; Peri, R.; Vasilyev, D.; Arias, R. High-throughput electrophysiology: an emerging paradigm for ion-channel screening and physiology. *Nature reviews Drug discovery* **2008**, *7*, 358-368.
260. Graef, J. D.; Benson, L. C.; Sidach, S. S.; Wei, H.; Lippiello, P. M.; Bencherif, M.; Fedorov, N. B. Validation of a high-throughput, automated electrophysiology platform for the screening of nicotinic agonists and antagonists. *Journal of biomolecular screening* **2013**, *18*, 116-127.
261. Asmild, M.; Oswald, N.; Krzywkowski, K. M.; Friis, S.; Jacobsen, R. B.; Reuter, D.; Taboryski, R.; Kutchinsky, J.; Vestergaard, R. K.; Schrøder, R. L. Upscaling and automation of electrophysiology: toward high throughput screening in ion channel drug discovery. *Receptors and Channels* **2003**, *9*, 49-58.
262. Kutchinsky, J.; Friis, S.; Asmild, M.; Taboryski, R.; Pedersen, S.; Vestergaard, R. K.; Jacobsen, R. B.; Krzywkowski, K.; Schrøder, R. L.; Ljungstrøm, T. Characterization of potassium channel modulators with QPatch™ automated patch-clamp technology: system characteristics and performance. *Assay and drug development technologies* **2003**, *1*, 685-693.
263. Alonso, E.; Alfonso, A.; Vieytes, M. R.; Botana, L. M. Evaluation of toxicity equivalent factors of paralytic shellfish poisoning toxins in seven human sodium channels types by an automated high throughput electrophysiology system. *Arch Toxicol* **2016**, *90*, 479-88.
264. Sui, Y.; Wu, Z. Alternative statistical parameter for high-throughput screening assay quality assessment. *J Biomol Screen* **2007**, *12*, 229-34.
265. Calduch Arques, A. Puesta a punto de la plataforma de patch clamp automático IonFlux para realizar cribados de alto rendimiento en Kv1. 1. **2017**.
266. Finkel, R. S. Read-through strategies for suppression of nonsense mutations in Duchenne/Becker muscular dystrophy: aminoglycosides and ataluren (PTC124). *Journal of child neurology* **2010**, *25*, 1158-1164.
267. Mingorance-Le Meur, A. Dravet syndrome pipeline and opportunities *Dracaena Report* **2017**.
268. Jensen, H. S.; Grunnet, M.; Bastlund, J. F. Therapeutic potential of Na v 1.1 activators. *Trends in pharmacological sciences* **2014**, *35*, 113-118.
269. Frederiksen, K.; Dunguo, L.; Yang, J.; Sindal Jensen, H.; Bastlund, J. F.; Larsen, P. H.; Henry, L.; Dekermendjian, K.; Badolo, L.; Laursen, M. A small molecule activator of Nav1. 1 channels increases fast-spiking interneuron excitability and GABAergic transmission in vitro and has anti-convulsive effects in vivo. *European Journal of Neuroscience* **2017**.
270. Anderson, L. L.; Hawkins, N. A.; Thompson, C. H.; Kearney, J. A.; George Jr, A. L. Unexpected Efficacy of a Novel Sodium Channel Modulator in Dravet Syndrome. *Scientific Reports* **2017**, *7*.
271. Hsiao, J.; Yuan, T.; Tsai, M.; Lu, C.; Lin, Y.; Lee, M.; Lin, S.; Chang, F.; Pimentel, H. L.; Olive, C. Upregulation of Haploinsufficient Gene Expression in the Brain by Targeting a Long Non-coding RNA Improves Seizure Phenotype in a Model of Dravet Syndrome. *EBioMedicine* **2016**, *9*, 257-277.
272. Brigo, F.; Igwe, S.; Bragazzi, N. Antiepileptic drugs for the treatment of infants with severe myoclonic epilepsy. *The Cochrane database of systematic reviews* **2017**, *5*, CD010483.
273. Garcia-Penas, J.; Jimenez-Legido, M. Infantile epileptic encephalopathies: what matters is genetics. *Revista de neurologia* **2017**, *64*, S65.



ANEXO I

Diseño del protocolo de medida para Ionflux-16™

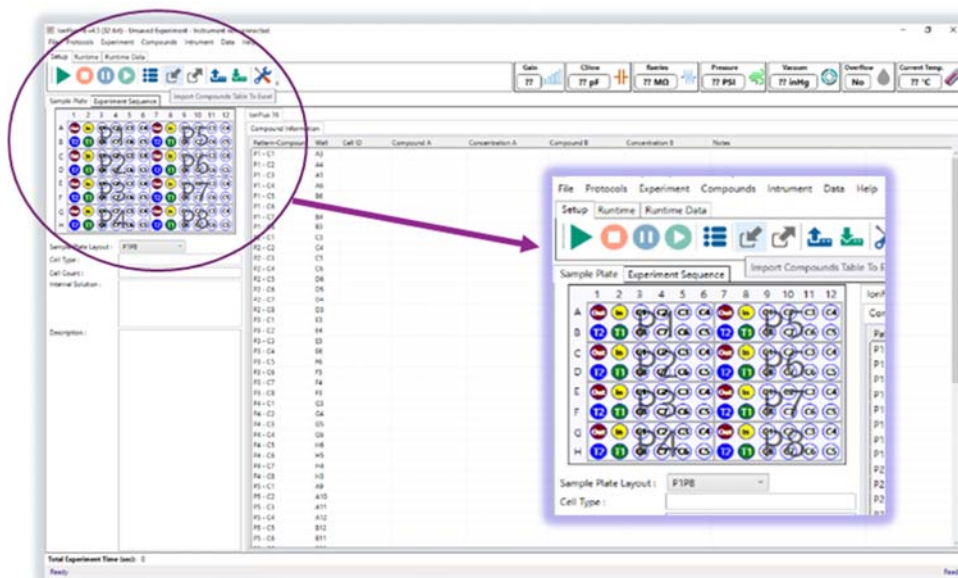


Figura AI- 1. Interfaz de la ventana de diseño de placa. Permite marcar con que zona de la placa se realiza el ensayo e indicar datos informativos del experimento.

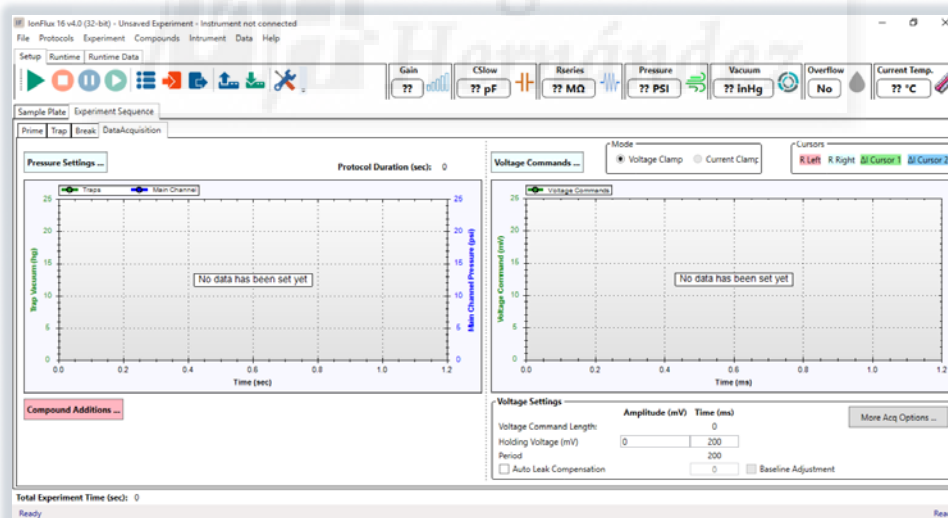


Figura AI- 2. Interfaz de los editores de presión y voltaje. La ventana de trabajo para editar los protocolos de presión y voltaje es común para los 4 subprotocolos. En la imagen nos encontramos dentro de *Data acquisition*.



Figura AI- 3. Interfaz del editor de presión. El editor de presión permite modificar las presiones ejercidas en el canal principal y a través de las trampas para el correcto flujo de fluidos y succión sobre las células.

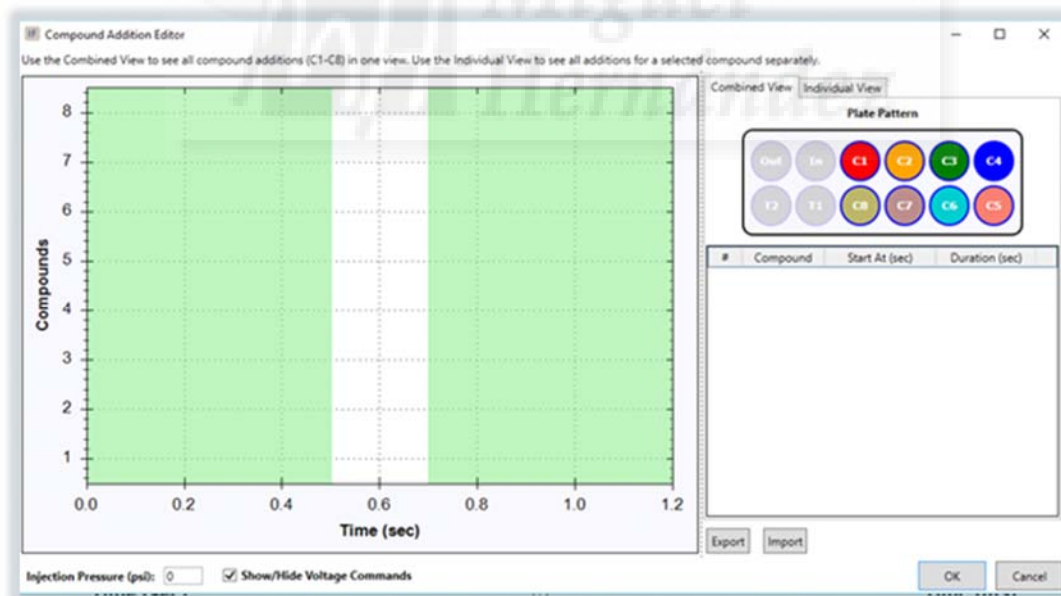


Figura AI- 4. Adición de compuestos. Permite diseñar el protocolo de tiempo y orden de adición de compuestos.

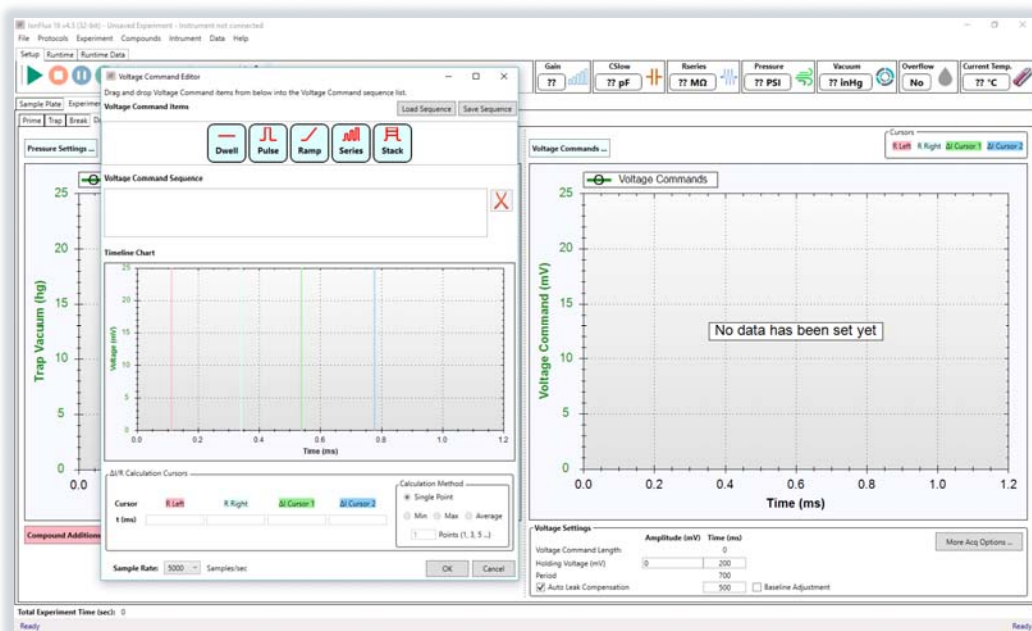


Figura AI- 5. Interfaz del editor de voltaje. En esta ventana se diseña el protocolo de voltaje que se aplica en las trampas, y la frecuencia en que se aplica. Aquí también se marcan los cursores para realizar los incrementos de intensidad y resistencia.

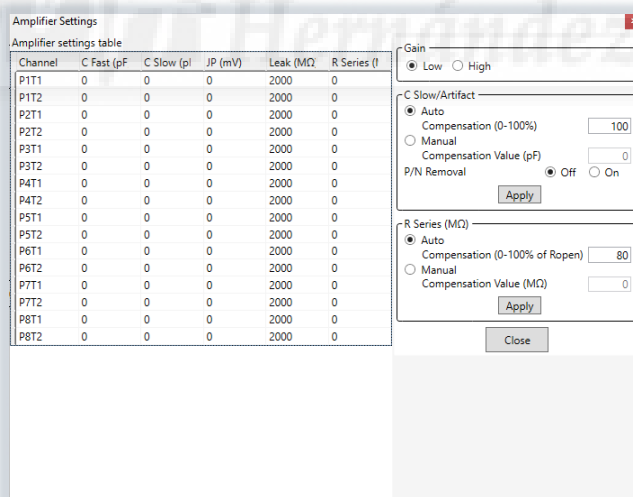


Figura AI- 6. Interfaz del control del amplificador. Para compensar de forma manual o automática los parámetros de la capacitancia, resistencia en serie y eliminación de artefactos.

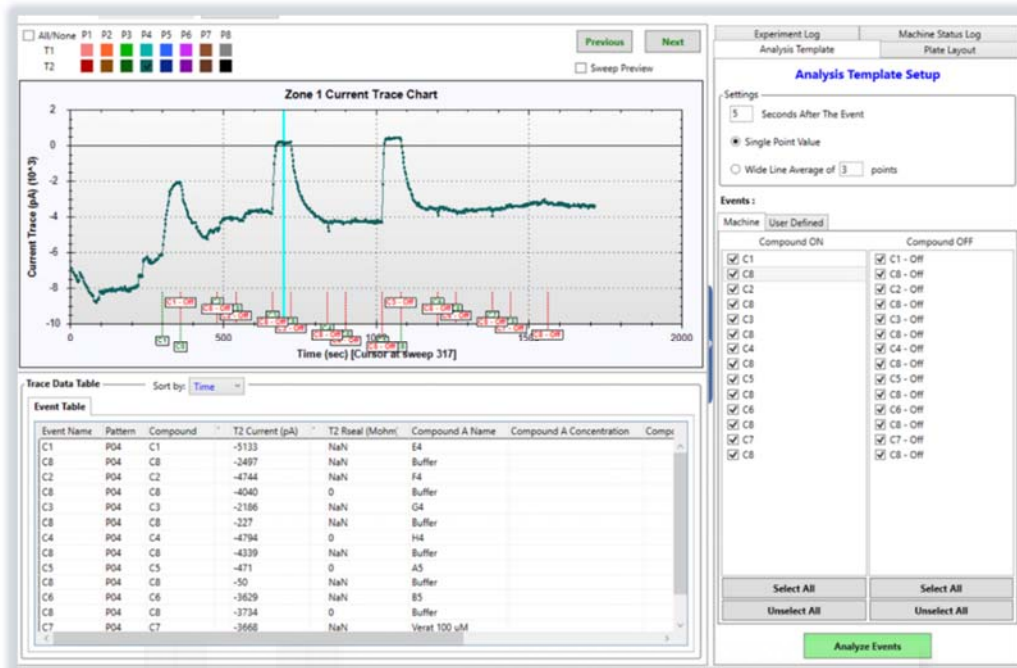
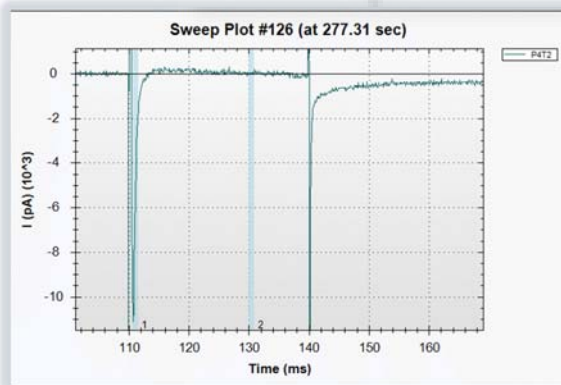


Figura AI- 7. Interfaz de la gráfica ΔI vs. Tiempo y el analizador de eventos. Ventana para el trabajo y la obtención offline de los datos crudos.

A



B

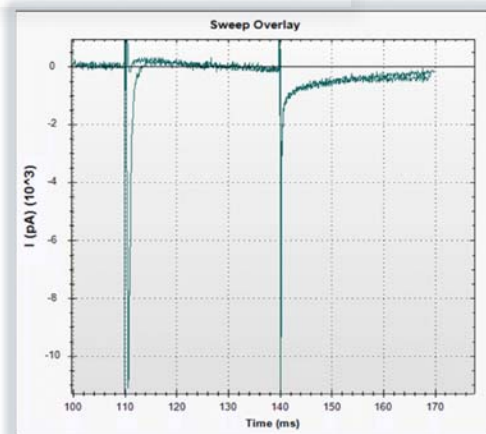


Figura AI- 8. Gráficas I vs. Tiempo. A) Gráfica de un único sweep. B) Gráfica "sweep overlay" con varios registros superpuestos.

Protocolos del procedimiento experimental

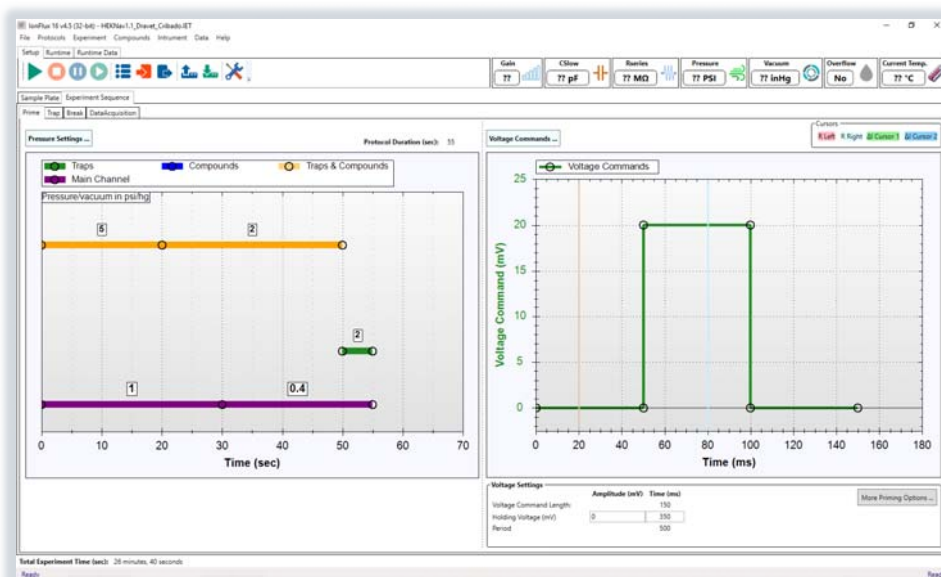


Figura AI- 9. Subprotocolo de *Prime*. Protocolo fijo para todas las líneas celulares, canales a estudio y ensayos.

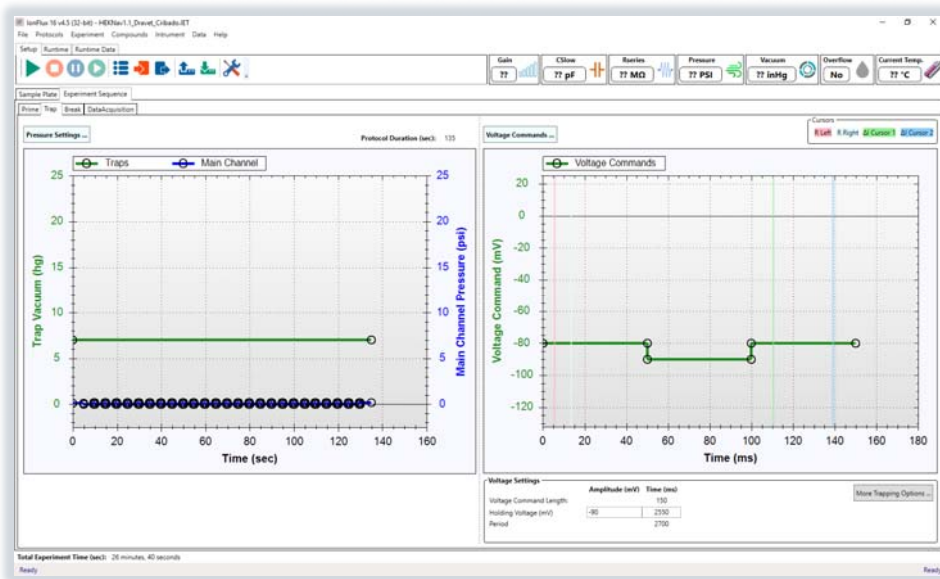


Figura AI- 10. Subprotocolo de *Trap* para HEK Y HEKNav1.1wt. Ventana de la izquierda, una serie de pulsos de presión positiva permiten el flujo correcto flujo de células para su succión en las trampas. Derecha, un pulso de voltaje a valores donde el canal Nav está inactivo.

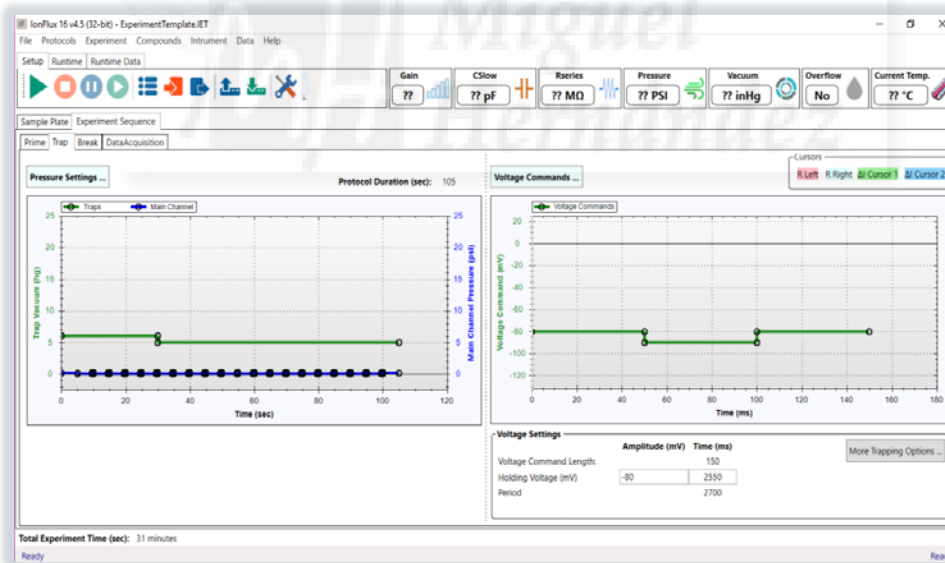


Figura AI- 11. Subprotocolo de *Trap* para CHO Y CHONav1.6wt. Subprotocolo similar a la figura AI-II. La presión negativa de las trampas es algo menor por el menor tamaño de estas líneas celulares.

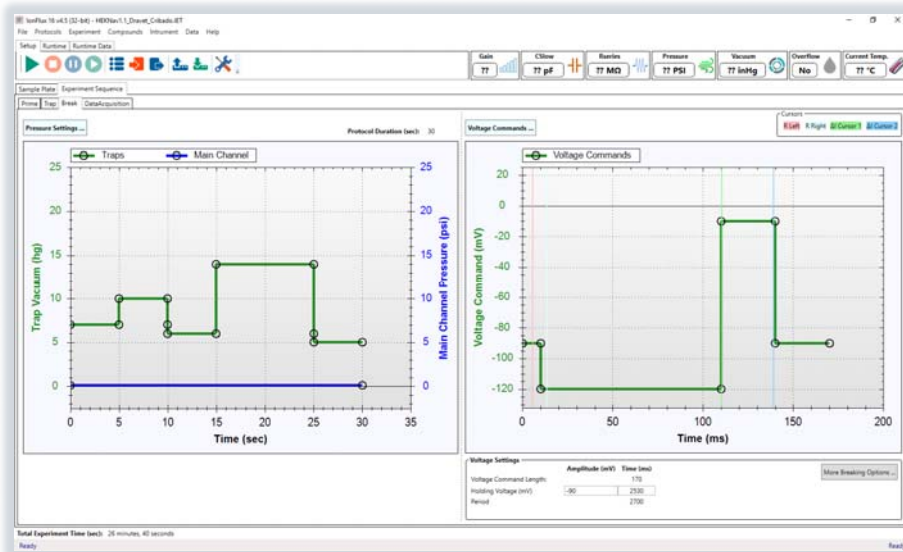


Figura AI- 12. Subprotocolo de *Break* para las líneas HEK y HEKNav1.1wt. Protocolo de presión de succión, a la izquierda, de dos pulsos. Se marca un pulso de voltaje, a la derecha, hasta -120 mV, para asegurar canal Nav cerrado.

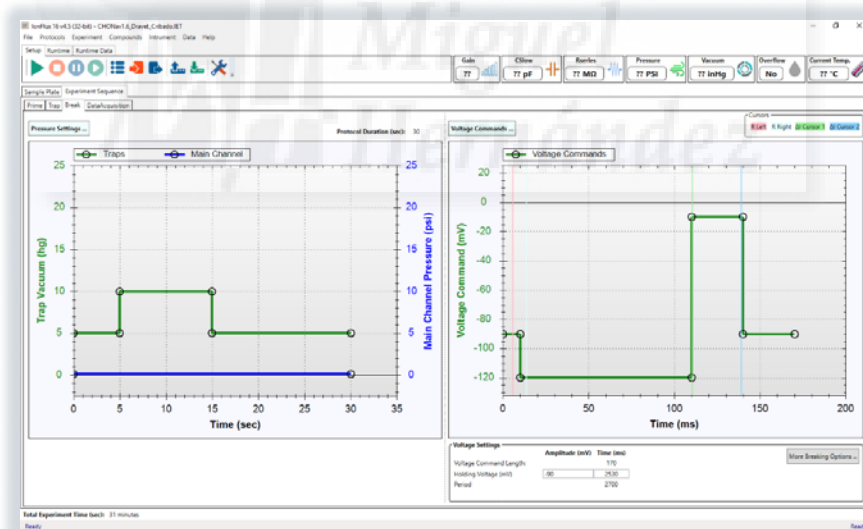
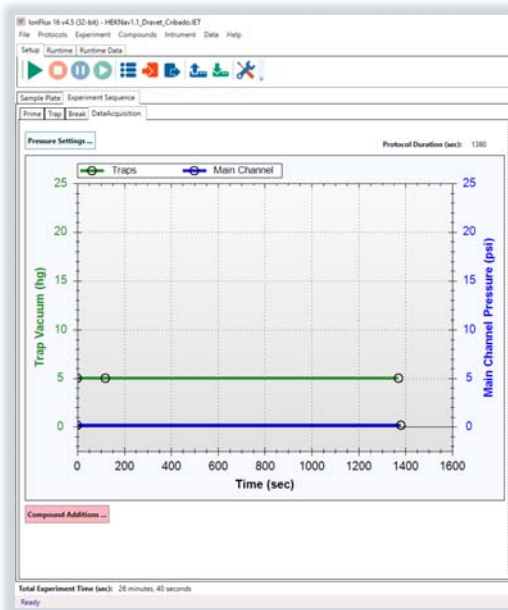


Figura AI- 13. Subprotocolo de *Break* para las líneas CHO y CHONav1.6wt. Protocolo de presión de succión, a la izquierda, de un único pulso por el menor tamaño de las líneas celulares. El pulso de voltaje no varía respecto a la gráfica anterior.

A



B

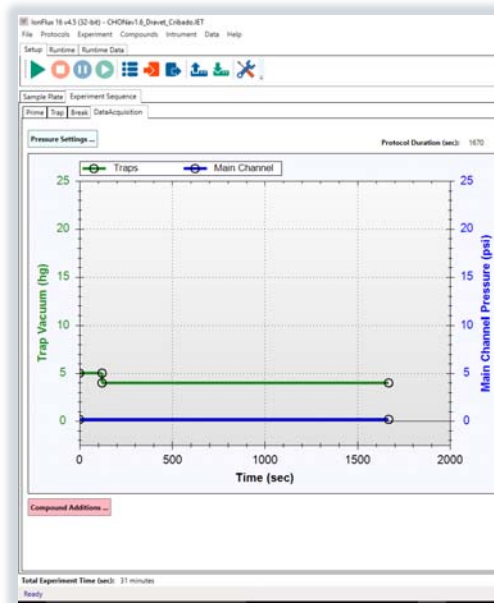
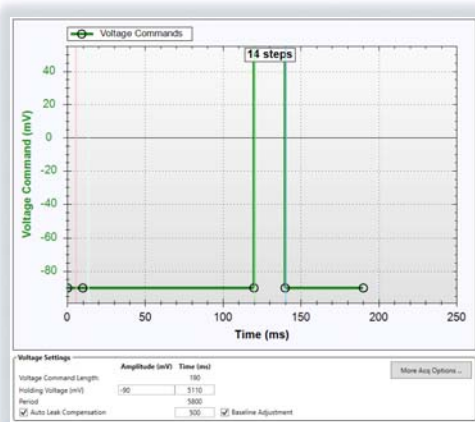
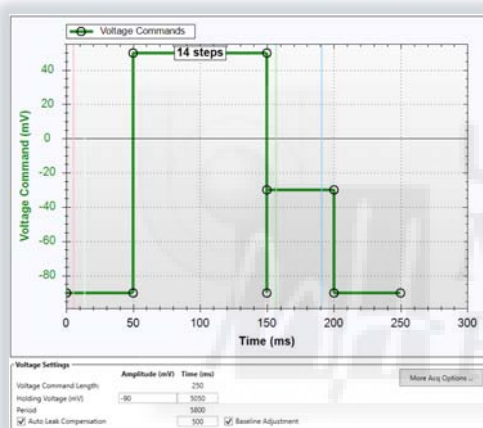


Figura AI- 14. Protocolos de presión durante la fase de *Data acquisition*. A) Protocolo de presión para HEK y HEKNav1.1wt. B) Protocolo de presión para CHO y CHONav1.6wt. La succión disminuye ligeramente para evitar lisis de estas líneas celulares más pequeñas.

A



B



C

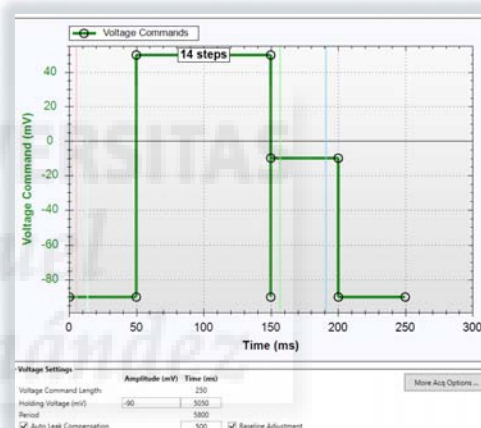


Figura AI- 15. Protocolos de medida para las curvas I-V, G/Gmax -V y I/Imax-V. A) Subprotocolo de voltaje para obtener las curvas I-V para todas las líneas celulares. **B)** Subprotocolo de voltaje para obtener las curvas de inactivación para HEKNav1.1wt y CHONav1.6wt. **C)** Subprotocolo de voltaje para obtener las curvas de inactivación para CHO.

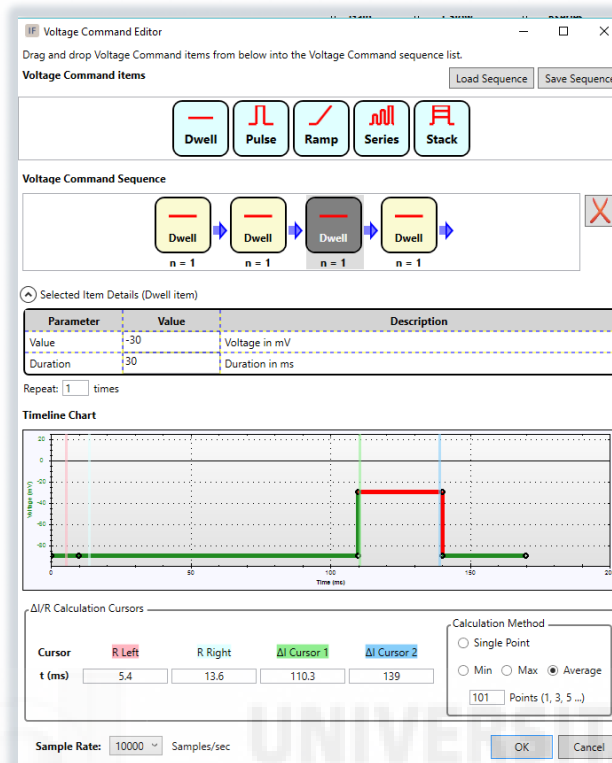


Figura AI- 16. Protocolo de voltaje. Ventana de trabajo para la construcción del protocolo de voltaje. En la inferior se aprecia el ratio de registros por segundo. Se observa el pulso de voltaje aplicado para la puesta a punto cribado de la librería NIHCC.

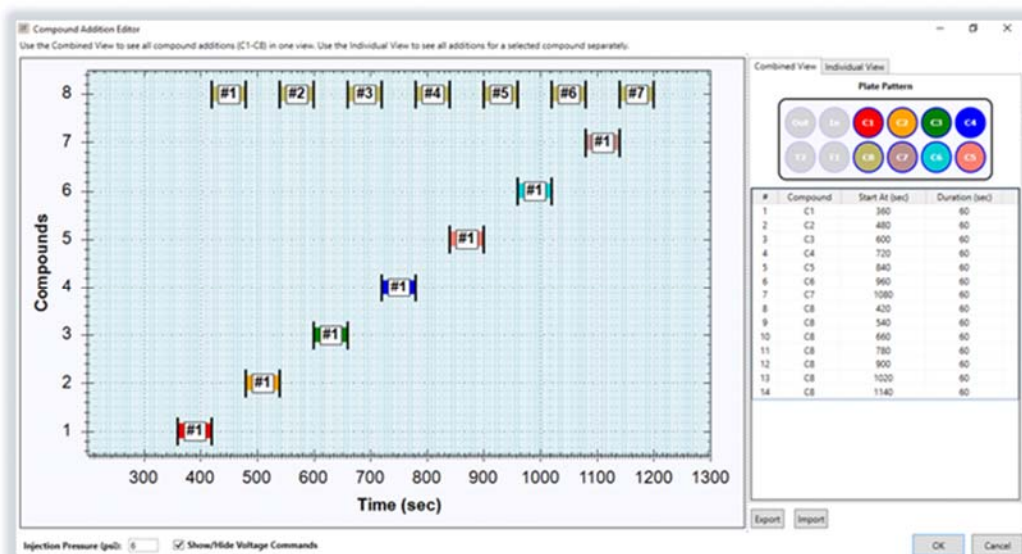


Figura AI- 17. Protocolos de adición de compuestos para el cribado. El C1 comienza a los 360 s del inicio del experimento. De C1 a C7 el tiempo de adición de cada uno es de 60 s, y un lavado con buffer entre ellos, de 120 s, que se encuentra en C8.

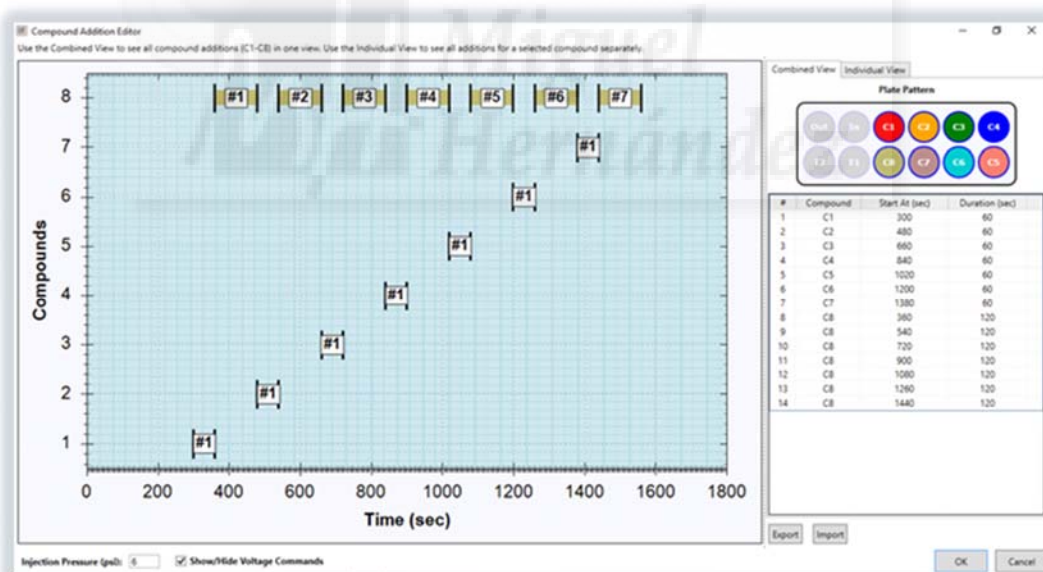


Figura AI- 18. Protocolos de adición de compuestos para la dosis-respuesta. El C1 comienza a los 300 s del inicio del experimento. Tanto los compuestos, de C1 a C7, como el lavado buffer, en C8, tiene un tiempo de aplicación de 120s.



ANEXO II

Factor Z

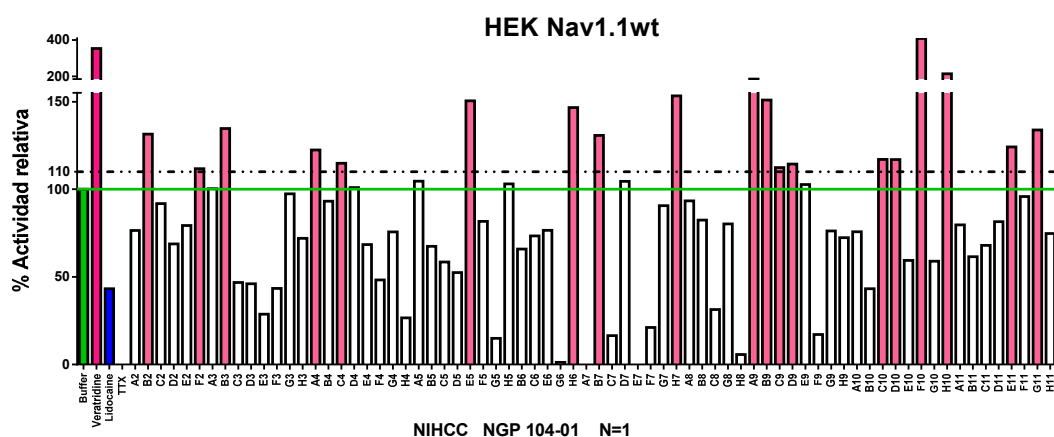
Tabla AII- 1. Factor Z para Nav1.1. Valores de los incrementos de corriente con la línea HEKNav1.1wt en presencia de buffer (izquierda) y lidocaína 1mM (derecha) utilizados para el cálculo del factor Z.

		HEKNav1.1wt															
		Buffer								Lidocaína 1mM							
Time (s)		P1T1 (pA)	P1T2 (pA)	P2T1 (pA)	P2T2 (pA)	P3T1 (pA)	P3T2 (pA)	P4T1 (pA)	P4T2 (pA)	P5T1 (pA)	P5T2 (pA)	P6T1 (pA)	P6T2 (pA)	P7T1 (pA)	P7T2 (pA)	P8T1 (pA)	P8T2 (pA)
C1	310	2038	5126	7369	4769	5321	6638	-405	-308	1272	163	-516	487	337	1646	1868	826
	320	1938	5019	7294	4720	5211	6525	-404	-250	1215	77	-578	180	354	1538	1763	779
	330	1883	4888	7155	4669	5158	6478	-371	-467	1147	-16	-598	86	244	1498	1714	753
	340	1799	4837	7071	4633	5081	6315	-357	-470	1119	-144	-633	63	226	1485	1669	716
	350	1714	4686	6915	4620	5034	6285	-365	-449	1130	-140	-655	-33	228	1485	1578	676
	360	1632	4699	6725	4515	5001	6233	-405	-422	1098	-78	-679	-45	203	1368	1552	619
C2	430	1694	4259	6482	4620	4942	5703	-287	-487	1101	13	-757	109	372	1412	1551	414
	440	1575	4202	6517	4585	4980	5576	-200	-487	1002	-59	-869	84	264	1355	1458	309
	450	1575	4172	6487	4540	5046	5583	-210	-476	880	-183	-930	40	217	1348	1429	212
	460	1538	4054	6544	4636	4949	5371	-235	-509	785	-138	-967	56	168	1331	1441	189
	470	1456	4044	6637	4524	4838	5203	-300	-518	592	-154	-1045	42	143	1300	1440	119
	480	1452	4026	6571	4546	4848	5072	-315	-441	550	-255	-1007	-34	148	1319	1334	112
C3	550	1813	3823	6479	4879	4648	4619	-289	-304	655	-207	-1130	17	300	1364	1511	224
	560	1953	3761	6358	4891	4579	4500	-283	-311	509	-274	-1267	13	194	1232	1456	93
	570	2001	3691	6361	4703	4504	4494	-264	-243	536	-277	-1286	58	132	1201	1451	61
	580	2087	3658	6343	4639	4503	4396	-279	-162	475	-306	-1326	10	-2	1186	1433	25
	590	1993	3664	6287	4657	4348	4316	-250	-129	473	-339	-1358	56	14	1129	1479	-43
	600	1933	3631	6354	4635	4327	4195	-247	-121	398	-375	-1419	70	15	1087	1439	-82
C4	670	1978	3532	6246	4601	3588	2690	-438	-116	489	-125	-1493	459	112	937	1420	-35
	680	1736	3429	6050	4508	3460	2629	-386	-149	342	-296	-1559	393	6	841	1286	-111
	690	1893	3356	6125	4584	3495	2788	-322	-115	393	-285	-1588	366	-33	815	1195	-192
	700	1767	3289	5920	4448	3536	2803	-304	-145	401	-327	-1593	328	-69	818	1290	-210
	710	1764	3131	5715	4544	3481	2583	-445	-243	326	-348	-1648	332	-117	801	1181	-256
	720	1598	3087	5702	4689	3503	2679	-433	-229	307	-344	-1653	253	-161	755	1247	-231
C5	790	1491	2971	5531	4946	4311	3378	-138	-237	376	114	-1590	297	-80	823	1250	-173
	800	1720	2887	5444	4977	3914	3326	-135	-245	381	104	-1667	266	-238	657	1244	-233
	810	1671	2806	5299	4916	4037	3243	-164	-235	298	96	-1665	233	-246	646	1148	-241
	820	1715	2720	5380	4903	3977	3236	-154	-197	272	122	-1738	198	-285	569	1076	-260
	830	1517	2657	4723	4930	4048	3146	-167	-280	166	110	-1740	222	-360	583	1083	-317
	840	1447	2606	4820	4932	4069	3008	48	-293	278	15	-1797	217	-414	557	1063	-330
C6	910	1401	2471	5017	5084	4148	2878	80	-304	179	96	-1660	371	-397	600	1043	-184
	920	1377	2420	4900	5060	4066	2914	32	-273	216	24	-1751	334	-491	553	1025	-224
	930	1294	2364	4875	5031	3980	2865	10	-306	104	58	-1786	249	-544	488	963	-265
	940	1241	2281	4937	4993	4012	2800	0	-315	-30	-51	-1818	237	-592	477	804	-333
	950	1280	2279	4862	4916	3915	2644	144	-364	-52	47	-1830	204	-648	484	786	-303
	960	1154	2233	4805	4933	3944	2601	151	-353	-45	-3	-1844	198	-707	458	835	-299
C7	1030	1363	2139	4735	4869	4162	2499	195	-269	107	156	-1938	254	-646	558	862	-333
	1040	1371	2014	4633	4950	4123	2516	215	-283	39	49	-2008	216	-716	443	776	-364
	1050	1313	2005	4584	4831	4277	2187	359	-279	64	33	-2025	173	-792	403	711	-352
	1060	1361	1962	4391	4779	4339	2319	337	-270	-293	11	-2029	139	-821	395	671	-385
	1070	1610	1924	4495	4735	4408	2220	281	-241	-190	-22	-2049	86	-830	355	649	-437
	1080	1564	1857	4319	4729	4385	2318	233	-258	-168	-67	-2095	67	-870	354	670	-432
C8	1150	1810	1833	5025	4457	4635	2294	108	-195	-239	-8	-2124	79	-743	562	758	-346
	1160	1739	1903	5147	4366	4776	2266	101	-222	-247	-166	-2189	30	-789	500	655	-374
	1170	1751	1806	5082	4466	4820	2086	117	-215	-187	-223	-2271	22	-909	459	587	-401
	1180	1862	1718	5196	4408	4901	1855	127	-190	-331	-235	-2296	-4	-901	448	636	-483
	1190	1779	1713	5194	4323	4895	1787	119	-221	-372	-241	-2341	-99	-872	447	603	-465
	1200	1834	1655	5225	4286	4894	1858	138	-290	-298	-302	-2429	-151	-896	311	625	-485
Promedio		2856								76							
Dvest		2221								848							
Zfactor										-1.487							

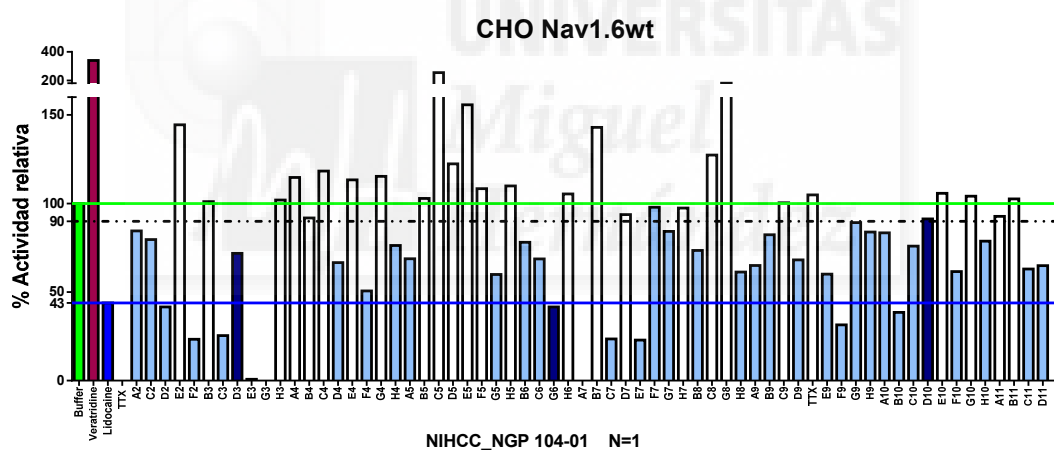
Tabla AII- 2. Factor Z para Nav1.6. Valores de los incrementos de corriente con la línea CHONav1.6wt en presencia de buffer (izquierda) y lidocaína 1mM (derecha) utilizados para el cálculo del factor Z.

	CHONav1.6wt																
	Time (s)	Buffer								Lidocaína 1mM							
P1T1 (pA)		P1T2 (pA)	P2T1 (pA)	P2T2 (pA)	P3T1 (pA)	P3T2 (pA)	P4T1 (pA)	P4T2 (pA)	P5T1 (pA)	P5T2 (pA)	P6T1 (pA)	P6T2 (pA)	P7T1 (pA)	P7T2 (pA)	P8T1 (pA)	P8T2 (pA)	
C1	310	3660	5515	2962	3352	4583	3378	3620	4055	1459	1406	751	791	3969	2119	182	1111
	320	3773	5364	2903	3233	4668	3405	3684	4598	1394	1298	702	839	3942	2315	137	1126
	330	3831	5327	3002	3258	4719	3441	3613	4729	1310	1161	606	835	4001	2304	88	950
	340	3711	5365	3074	3371	4886	3402	3387	4659	1343	929	553	839	4339	2144	-25	991
	350	3777	5248	3102	3324	4984	3231	3687	4093	1427	797	492	790	4450	2428	-111	937
	360	3896	5164	2974	3391	5176	3176	3538	4262	1549	745	404	813	4480	2458	-138	858
C2	430	3526	4973	2608	3413	4480	3053	3253	3881	669	618	421	767	1293	418	-223	906
	440	3324	4958	2620	3380	4396	3090	3355	3734	644	504	323	692	1230	542	-328	832
	450	3318	4956	2638	3378	4621	2920	3515	3629	583	578	267	733	1139	530	-323	897
	460	3313	4921	2670	3410	4613	2721	3541	3721	492	697	241	638	1031	504	-437	817
	470	3175	4769	2486	3362	4803	2704	3663	3298	431	685	209	621	963	669	-395	878
	480	3107	4658	2439	3431	4848	2595	3829	3095	402	625	235	526	880	562	-420	920
C3	550	3979	4045	2321	3063	4533	2189	3627	2924	-9	327	101	402	332	232	-356	917
	560	3931	3967	2283	3014	4417	1945	3597	2967	-114	242	81	358	311	74	-495	664
	570	3878	3967	2276	2997	4423	1920	3435	2848	-169	237	52	365	278	125	-488	638
	580	3715	3972	2239	3000	4344	1839	3460	2714	-254	169	17	301	226	63	-525	628
	590	3913	3910	2315	2968	4250	1691	3485	3077	-285	113	0	284	168	48	-550	544
	600	3792	3845	2243	2926	4373	1622	3443	2796	-264	104	-35	323	148	65	-562	433
C4	670	3873	3731	2371	3042	3906	1464	3692	2183	-248	300	-84	272	-8	347	-641	381
	680	3797	3705	2407	3002	4180	1380	3610	2369	-330	192	-150	231	-63	301	-755	294
	690	3744	3694	2398	2998	4206	1396	3665	2054	-345	51	-140	286	-27	194	-813	222
	700	3764	3685	2481	2990	4268	1223	3297	2090	-324	-36	-148	281	-143	186	-834	193
	710	3772	3671	2532	3012	4187	1203	3234	2028	-382	-72	-165	267	-105	250	-846	184
	720	3653	3516	2499	3021	4204	1093	3240	1974	-398	-33	-182	218	-142	70	-845	160
C5	790	3685	3509	3288	3100	3873	1196	3019	1934	-416	41	-95	247	94	317	-541	292
	800	3658	3295	3255	3067	3790	1200	2824	1624	-459	-75	-134	154	79	251	-594	189
	810	3747	3181	3134	3065	3812	1097	2654	1502	-463	-93	-147	53	94	170	-629	172
	820	3728	3173	3058	3643	3743	1061	2599	2029	-422	-147	-153	40	106	173	-681	225
	830	3721	3138	3010	3656	3793	1043	2513	2054	-470	-144	-199	34	55	98	-708	206
	840	3729	3062	2976	3580	3954	948	2453	2020	-446	-177	-249	2	-3	87	-689	192
C6	910	3843	2984	2830	3131	3835	1138	2084	2365	-519	-135	-218	-152	-86	214	-684	173
	920	3771	2987	2620	3058	3627	969	1981	2236	-541	-209	-256	-191	-131	125	-702	115
	930	3663	2979	2603	3066	3528	920	1868	2326	-515	-206	-228	-263	-145	25	-721	55
	940	3694	2979	2561	2979	3466	835	1766	2319	-513	-215	-273	-227	-188	13	-767	-3
	950	3730	2866	2513	2974	3365	807	1774	2092	-523	-257	-255	-229	-199	17	-745	-29
	960	3725	2908	2439	2973	3287	1433	1694	2273	-529	-251	-257	-218	-209	-1	-783	7
C7	1030	3921	2731	2431	3059	2855	2216	1750	3193	179	-311	-226	-184	-131	-78	-742	109
	1040	3845	2464	2290	3031	2784	2253	1633	2966	199	-362	-215	-217	-150	-174	-764	12
	1050	3792	2408	2316	3058	2796	2226	1585	2877	173	-393	-226	-282	-139	-88	-792	3
	1060	3734	2387	2233	3109	2679	2254	1665	2721	126	-377	-256	-289	-168	-24	-810	-19
	1070	3670	2333	2136	3092	2603	2230	1625	2802	85	-409	-244	-326	-194	-73	-806	-34
	1080	3569	2276	2151	3079	2466	2179	1622	3060	48	-415	-259	-355	-208	-54	-829	-83
C8	1150	3404	2229	1974	2606	2334	2050	1349	3164	1087	623	-158	-415	1119	1779	-764	-30
	1160	3349	2188	1858	2561	2338	1908	1278	2983	1079	596	-145	-445	1198	1643	-817	-31
	1170	3304	2155	1787	2421	2246	1912	1125	3325	949	525	-175	-481	1223	1534	-796	-86
	1180	3233	2106	1740	2415	2260	1880	1059	3385	900	522	-214	-450	1229	1737	-830	-81
	1190	3309	2068	1648	2373	2196	1843	1038	3332	870	544	-182	-430	1398	1676	-825	-102
	1200	3265	2072	1697	2342	2129	1820	982	3300	704	440	-190	-453	1430	1601	-831	-104
Promedio		3016								223							
Dvest		949								789							
Zfactor		-0.8141															

Cribado de NIHCC, primera vuelta

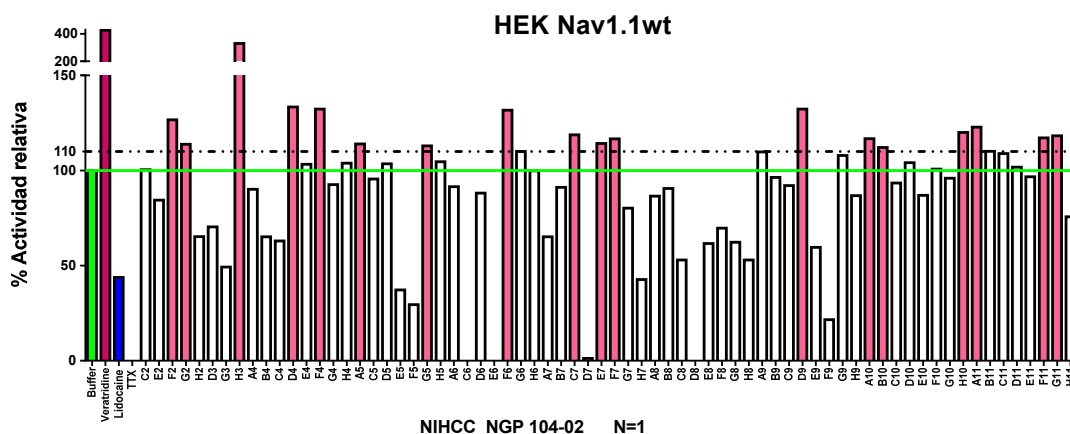


19 Candidatos N=2 : B2, F2, B3, H3, A4, E5, H6, B7, H7, A9, B9, C9, D9, C10, D10, F10, H10, E11, G11

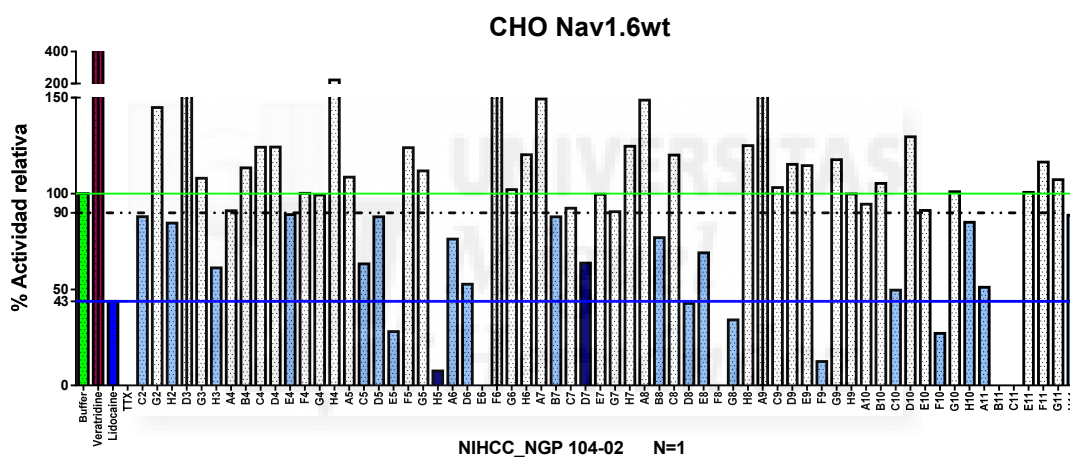


31 Candidatos N=2 A2, C2, D2, F2, C3, D4, F4, H4, A5, G5, B6, C6, C7, E7, G7, B8, H8, A9, D9, E9, F9, G9, H9, A10, B10, C10, F10, H10, C11, D11

Figura AII- 1. Cribado de NGP 104-01: Primera vuelta de la subserie NGP 104-01 en HEKNav1.1wt (arriba) y CHONav1.6wt (abajo). Para ambas gráficas, la línea y columna en verde fija el 100% de actividad de los canales, en presencia de buffer. En rosa se muestran todas las moléculas con las que Nav1.1 supera el 110% de actividad relativa, seleccionadas para la segunda vuelta. En azul claro, los inhibidores de Nav1.6 que disminuyen la actividad relativa por debajo de 90%, y que serían candidatos para la segunda vuelta. En azul oscuro, se marcan los bloqueadores irreversibles.



17 Candidatos N=2 F2, G2, H3, D4, F4, A5, G5, F6, C7, E7, F7, D9, A10, B10, H10, A11, F11, G11



17 Candidatos N=2 C2, H2, H3, E4, C5, D5, E5, A6, D6, B7, B8, D8, E8, G8, F9, C10, F10, H10, A11, H11

Figura AII- 2. Cribado de NGP 104-02. Primera vuelta de la subserie NGP 104-02 en HEKNav1.1wt (arriba) y CHONav1.6wt (abajo). Para ambas gráficas , la línea y columna en verde fija el 100% de actividad de los canales, en presencia de buffer. En rosa se muestran todas las moléculas con las que Nav1.1 supera el 110% de actividad relativa, seleccionadas para la segunda vuelta. En azul claro, los inhibidores de Nav1.6 que disminuyen la actividad relativa por debajo de 90 %, y que serían candidatos para la segunda vuelta. En azul oscuro, se marcan los bloqueadores irreversibles

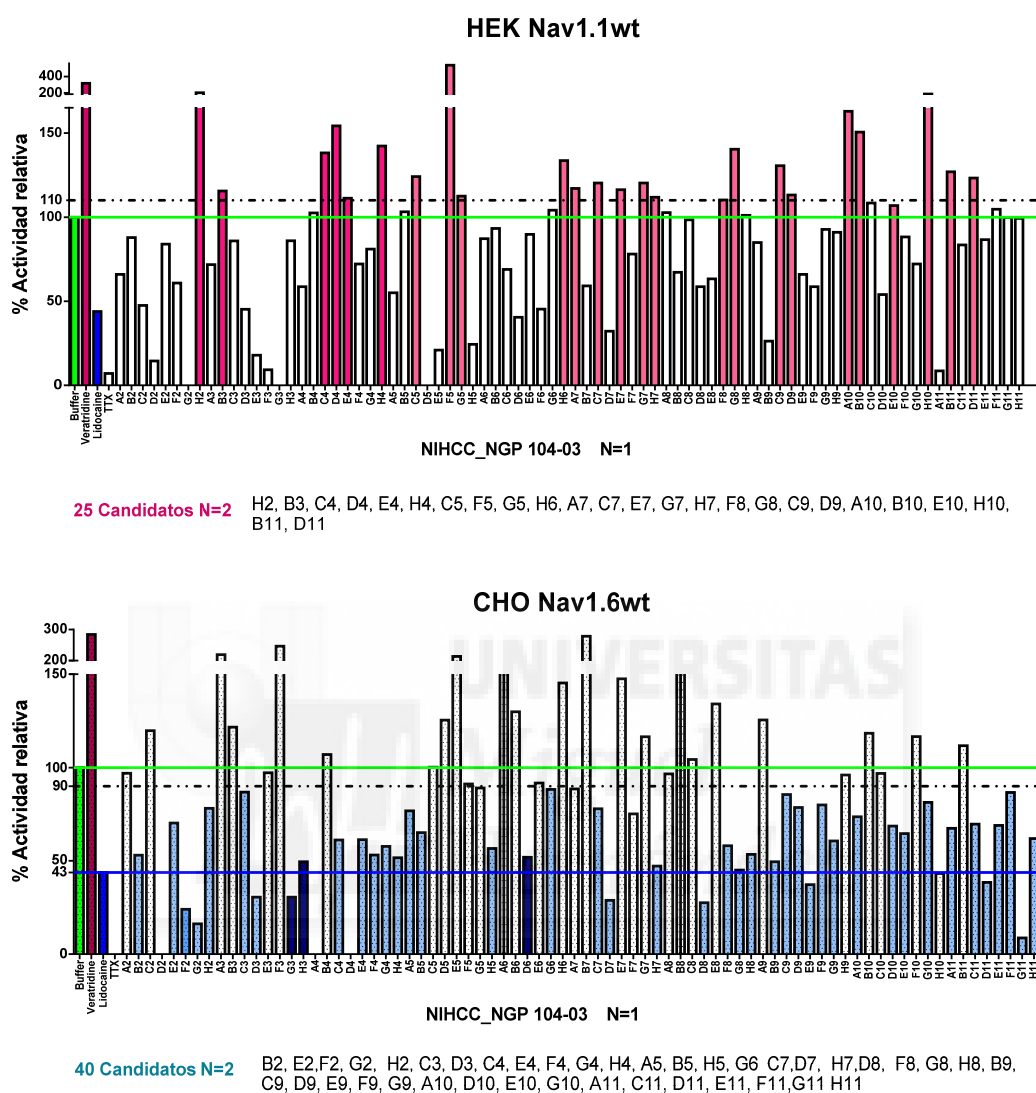
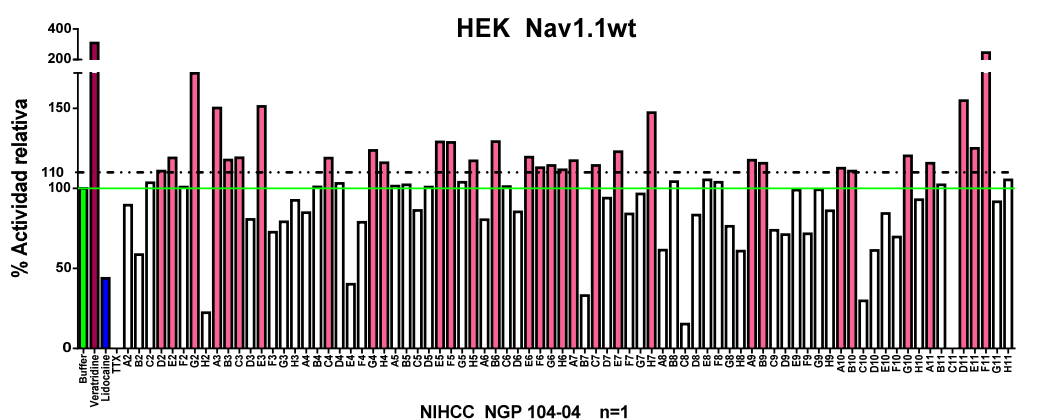
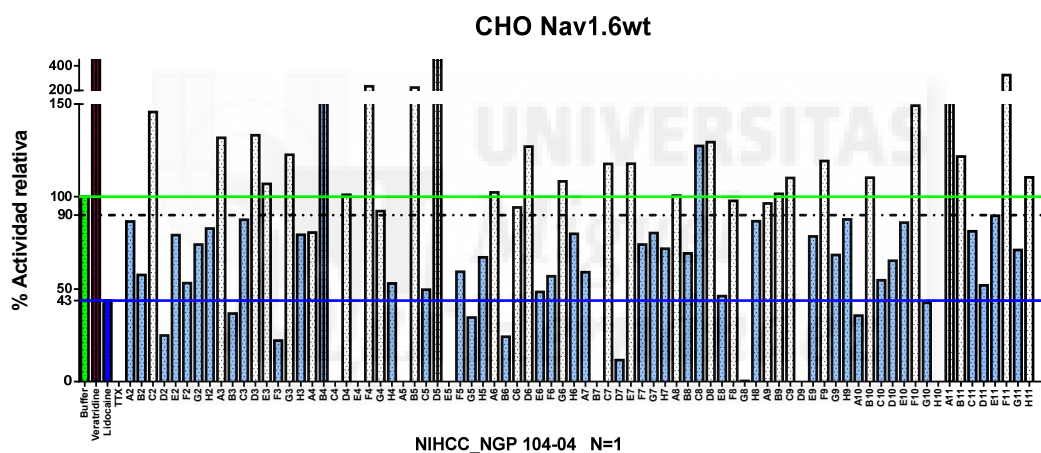


Figura AII- 3. Cribado de NGP 104-03. Primera vuelta de la subserie NGP 104-03 en HEKNav1.1wt (arriba) y CHONav1.6wt (abajo). Para ambas gráficas, la línea y columna en verde fija el 100% de actividad de los canales, en presencia de buffer. En rosa se muestran todas las moléculas con las que Nav1.1 supera el 110% de actividad relativa, seleccionadas para la segunda vuelta. En azul claro, los inhibidores de Nav1.6 que disminuyen la actividad relativa por debajo de 90%, y que serían candidatos para la segunda vuelta. En azul oscuro, se marcan los bloqueadores irreversibles.



NIHCC_NGP 104-04 n=1

30 Candidatos N=2 D2, E2, G2, A3, B3, C3, E3, C4, G4, H4, E5, F5, H5, B6, E6, F6, G6, H6, A7, C7, E7, H7, A9, B9, A10, B10, G10, D11, E11, F11,



NIHCC_NGP 104-04 N=1

41 Candidatos N=2 A2, B2, D2, E2, F2, G2, H2, B3, C3, F3, H3, B4, H4, C5, F5, G5, H5, B6, E6, F6, H6, A7, D7, F7, G7, H7, B8, C8, E8, H8, E9, G9, H9, A10, C10, D10, E10, G10, C11, D11, E11, G11

Figura AII- 4. Cribado de NGP 104-04. Primera vuelta de la subserie NGP 104-04 en HEKNav1.1wt (arriba) y CHONav1.6wt (abajo). Para ambas gráficas , la línea y columna en verde fija el 100% de actividad de los canales, en presencia de buffer. En rosa se muestran todos las moléculas con las que Nav1.1 supera el 110% de actividad relativa, seleccionadas para la segunda vuelta. En azul claro, los inhibidores de Nav1.6 que disminuyen la actividad relativa por debajo de 90 %, y que serían candidatos para la segunda vuelta. En azul oscuro, se marcan los bloqueadores irreversibles.

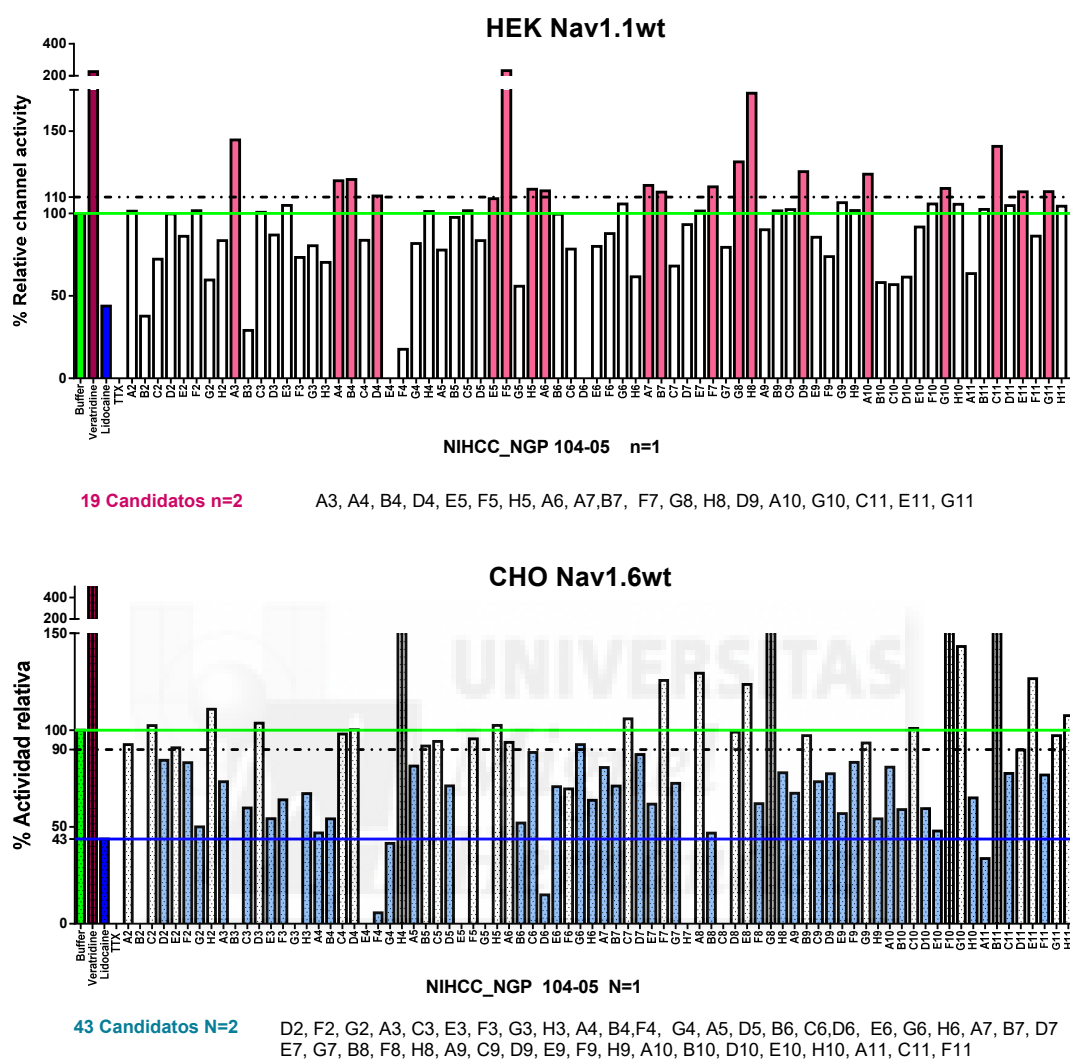


Figura AII- 5. Cribado de NGP 104-05. Primera vuelta de la subserie NGP 104-05 en HEKNav1.1wt (arriba) y CHONav1.6wt (abajo). Para ambas gráficas, la línea y columna en verde fija el 100% de actividad de los canales, en presencia de buffer. En rosa se muestran todas las moléculas con las que Nav1.1 supera el 110% de actividad relativa, seleccionadas para la segunda vuelta. En azul claro, los inhibidores de Nav1.6 que disminuyen la actividad relativa por debajo de 90 %, y que serían candidatos para la segunda vuelta. En azul oscuro, se marcan los bloqueadores irreversibles.

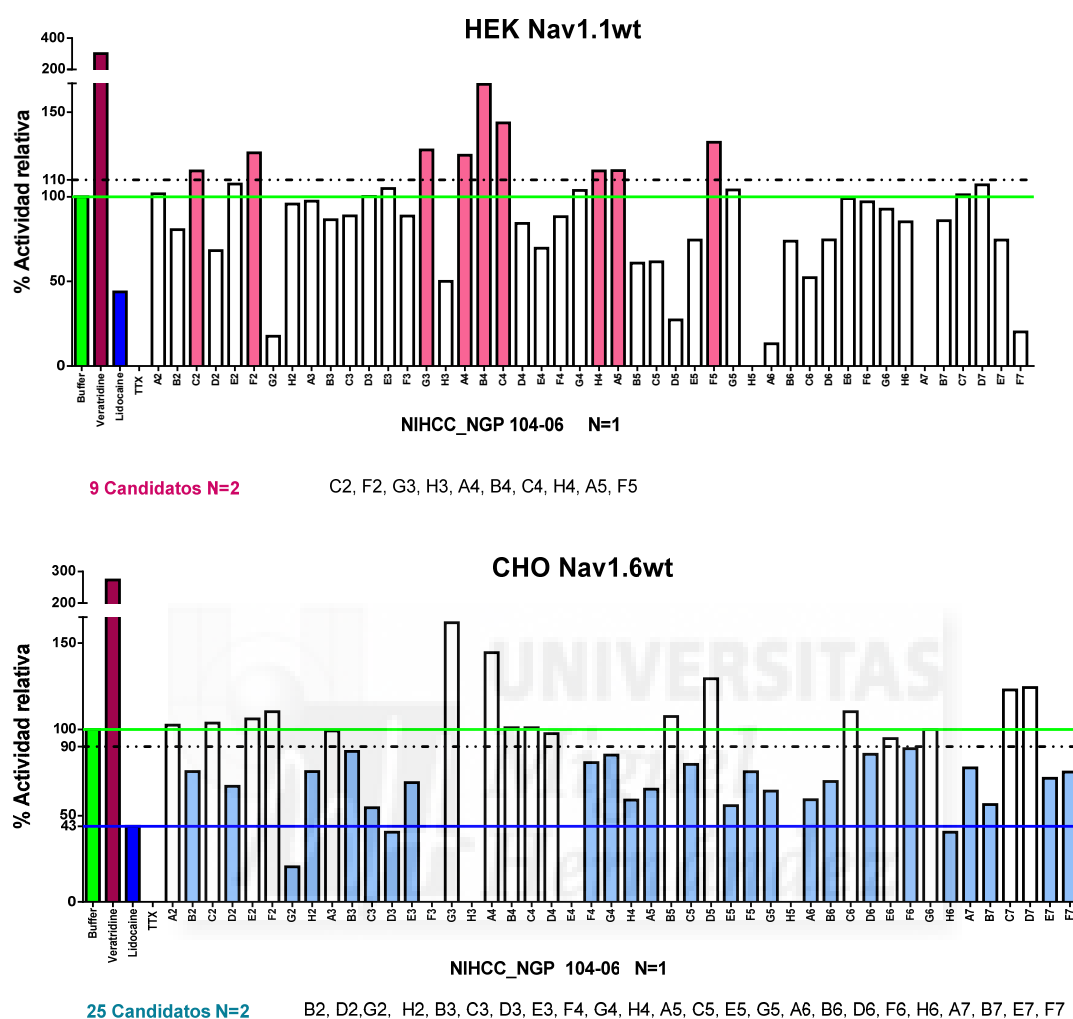


Figura AII- 6. Cribado de NGP 104-06. Primera vuelta de la subserie NGP 104-06 en HEKNav1.1wt (arriba) y CHONav1.6wt (abajo). Para ambas gráficas , la línea y columna en verde fija el 100% de actividad de los canales, en presencia de buffer. En rosa se muestran todos las moléculas con las que Nav1.1 supera el 110% de actividad relativa, seleccionadas para la segunda vuelta. En azul claro, los inhibidores de Nav1.6 que disminuyen la actividad relativa por debajo de 90 %, y que serían candidatos para la segunda vuelta. En azul oscuro, se marcan los bloqueadores irreversibles.

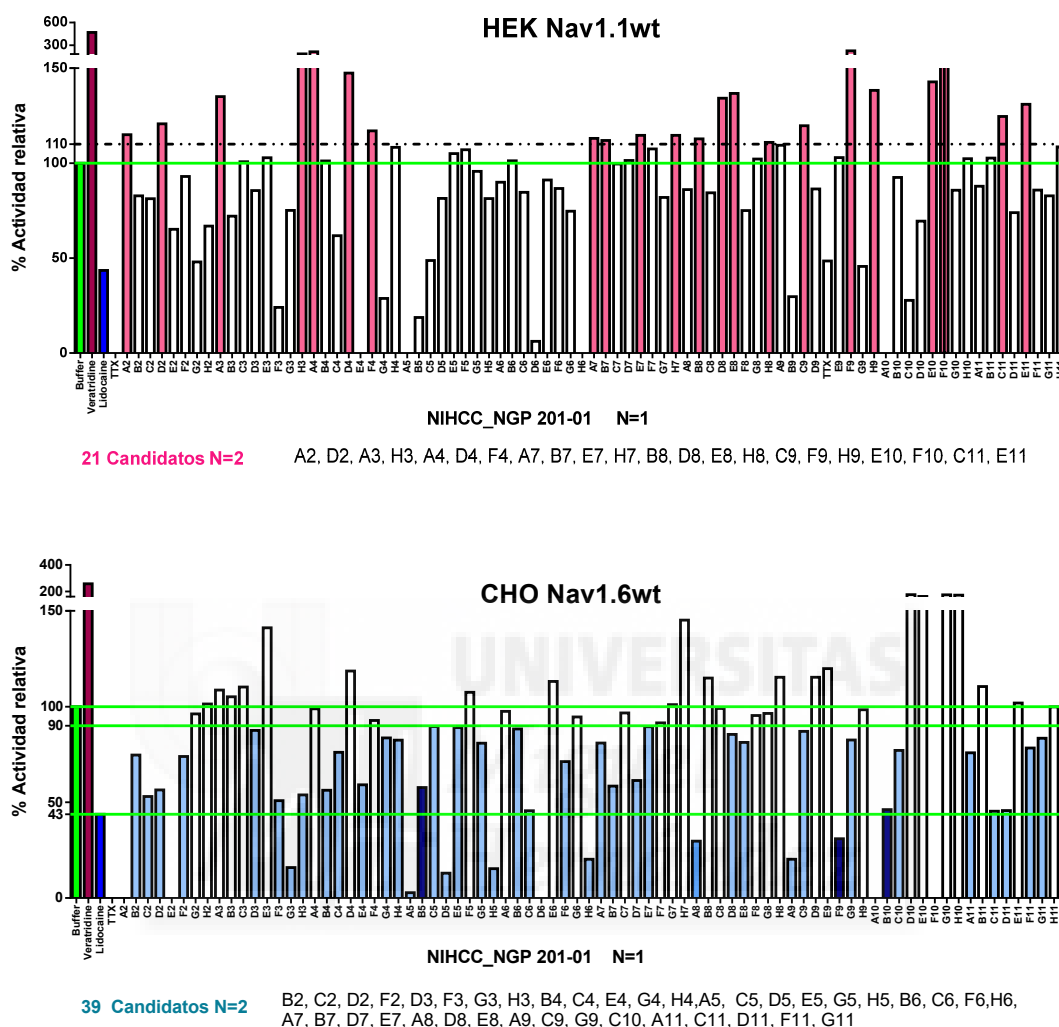


Figura AII- 7. Cribado de NGP 201-01. Primera vuelta de la subserie NGP 201-01 en HEKNav1.1wt (arriba) y CHONav1.6wt (abajo). Para ambas gráficas, la línea y columna en verde fija el 100% de actividad de los canales, en presencia de buffer. En rosa se muestran todas las moléculas con las que Nav1.1 supera el 110% de actividad relativa, seleccionadas para la segunda vuelta. En azul claro, los inhibidores de Nav1.6 que disminuyen la actividad relativa por debajo de 90 %, y que serían candidatos para la segunda vuelta. En azul oscuro, se marcan los bloqueadores irreversibles

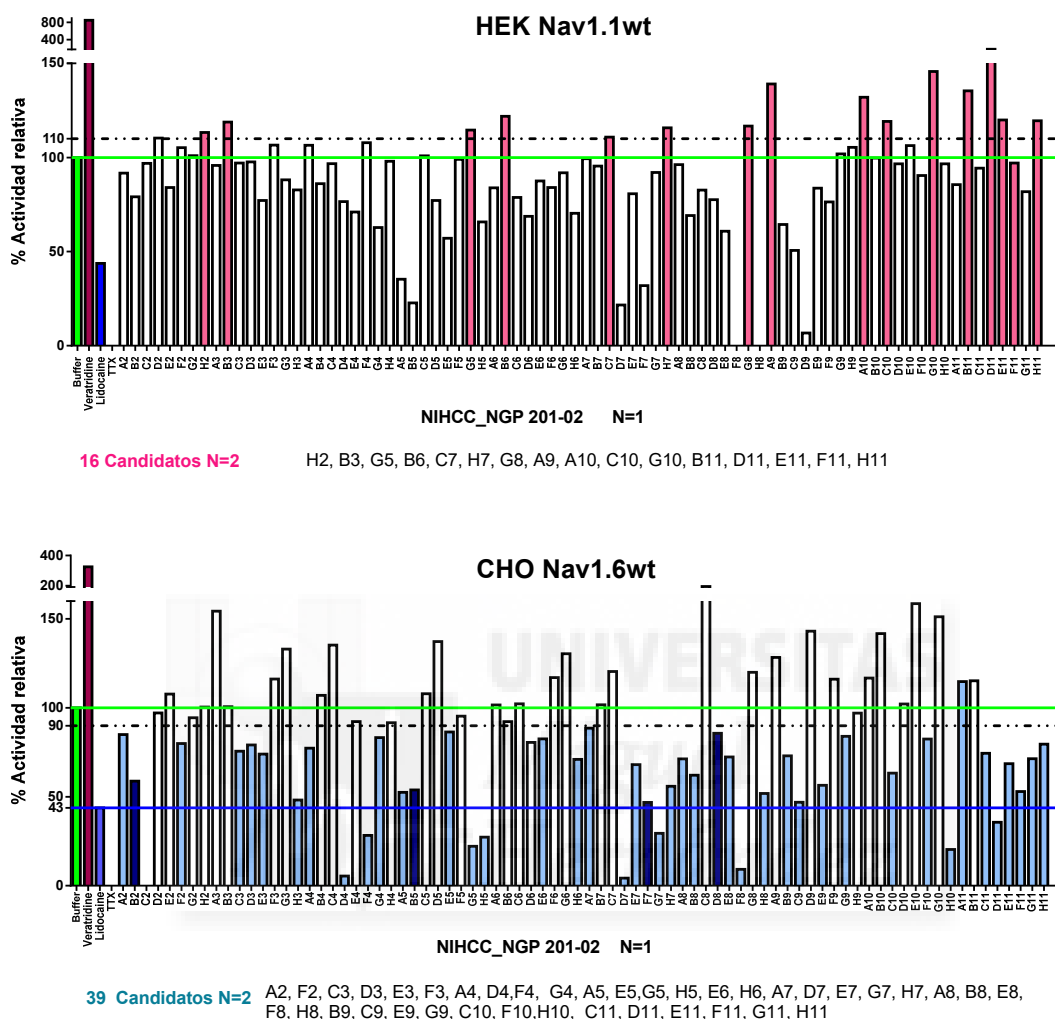


Figura AII- 8. Cribado de NGP 201-02. Primera vuelta de la subserie NGP 201-02 en HEKNav1.1wt (arriba) y CHONav1.6wt (abajo). Para ambas gráficas, la línea y columna en verde fija el 100% de actividad de los canales, en presencia de buffer. En rosa se muestran todas las moléculas con las que Nav1.1 supera el 110% de actividad relativa, seleccionadas para la segunda vuelta. En azul claro, los inhibidores de Nav1.6 que disminuyen la actividad relativa por debajo de 90 %, y que serían candidatos para la segunda vuelta. En azul oscuro, se marcan los bloqueadores irreversibles

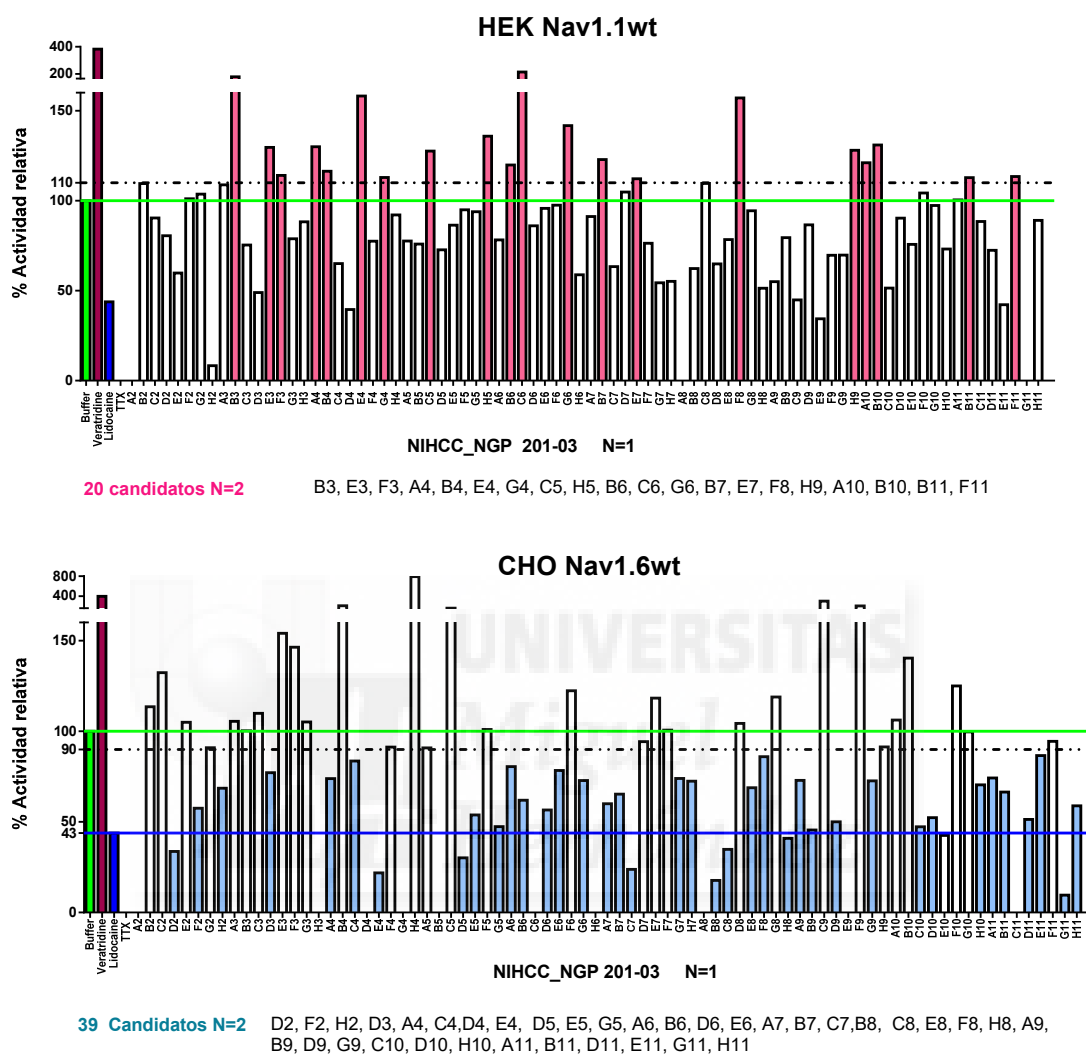


Figura AII- 9. Cribado de NGP 201-03. Primera vuelta de la subserie NGP 201-03 en HEKNav1.1wt (arriba) y CHONav1.6wt (abajo). Para ambas gráficas, la línea y columna en verde fija el 100% de actividad de los canales, en presencia de buffer. En rosa se muestran todas las moléculas con las que Nav1.1 supera el 110% de actividad relativa, seleccionadas para la segunda vuelta. En azul claro, los inhibidores de Nav1.6 que disminuyen la actividad relativa por debajo de 90 %, y que serían candidatos para la segunda vuelta. En azul oscuro, se marcan los bloqueadores irreversibles.

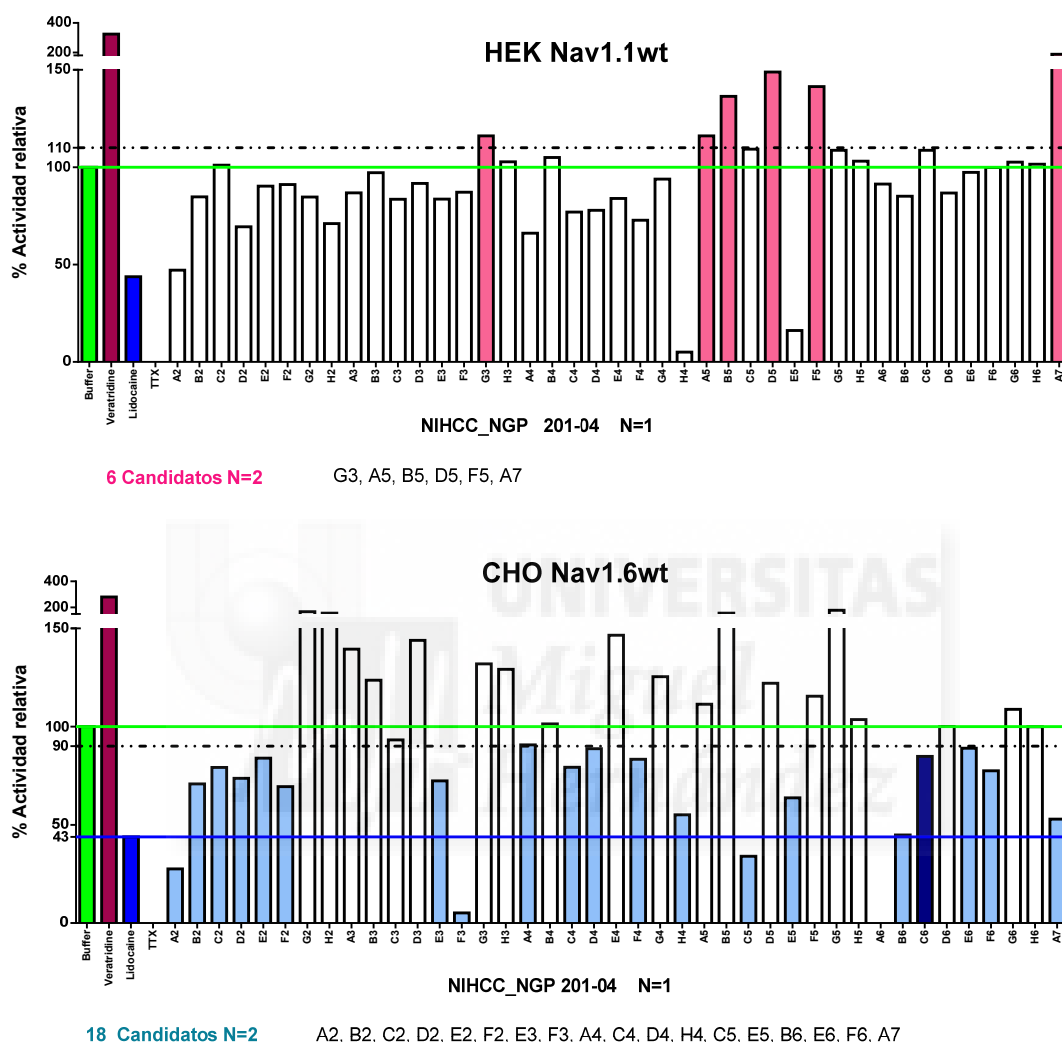
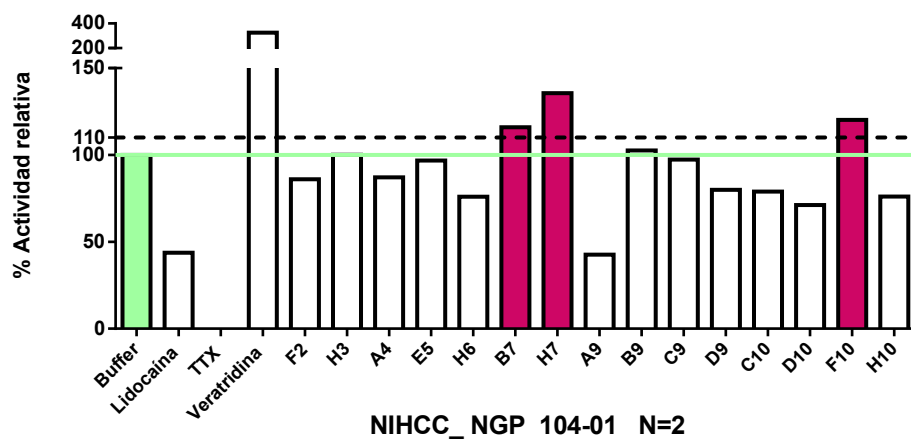
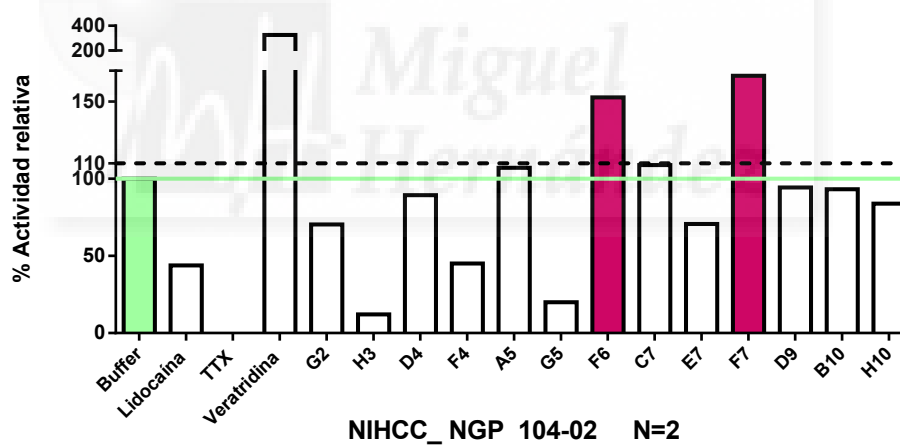


Figura AII- 10. Cribado de NGP 201-04. Primera vuelta de la subserie NGP 201-04 en HEKNav1.1wt (arriba) y CHONav1.6wt (abajo). Para ambas gráficas , la línea y columna en verde fija el 100% de actividad de los canales, en presencia de buffer. En rosa se muestran todos las moléculas con las que Nav1.1 supera el 110% de actividad relativa, seleccionadas para la segunda vuelta. En azul claro, los inhibidores de Nav1.6 que disminuyen la actividad relativa por debajo de 90 %, y que serían candidatos para la segunda vuelta. En azul oscuro, se marcan los bloqueadores irreversibles.

Cribado de NIHCC, segunda vuelta

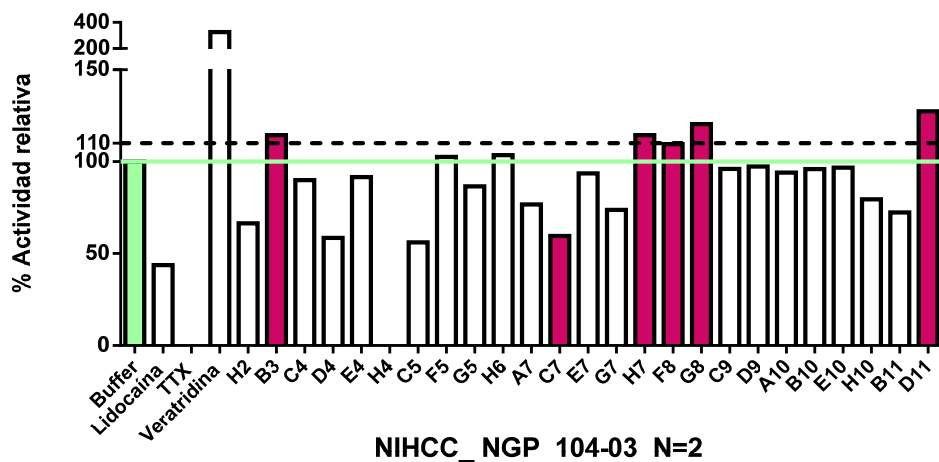


Candidatos N=3 : B7, H7, F10

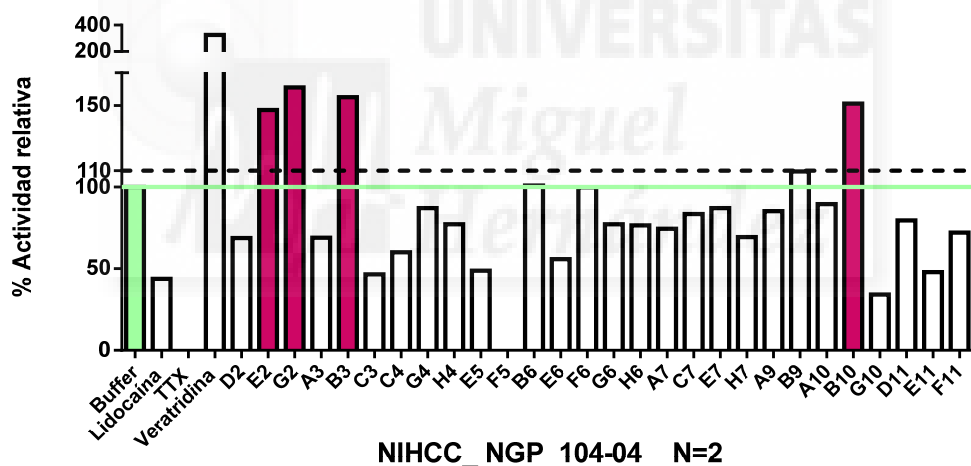


Candidatos N=3 : F6, F7

Figura All- 11. Segunda vuelta para NGP 104-01 y NGP 104-02. "n2" para los potenciales activadores de las subseries 1 y 2 de la serie NGP-104, sobre HEKNav1.1wt.

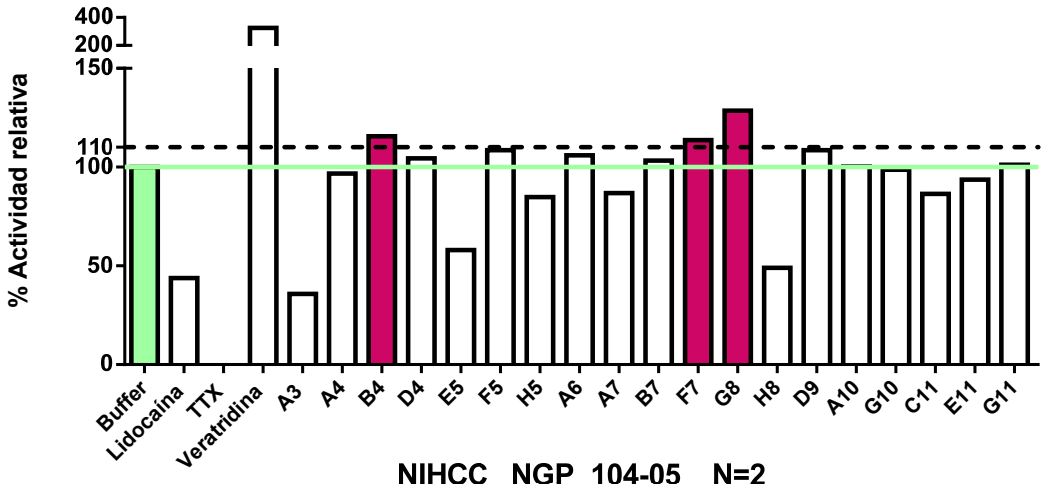


Candidatos N=3 : B3, C7, H7, F8, G8, D11

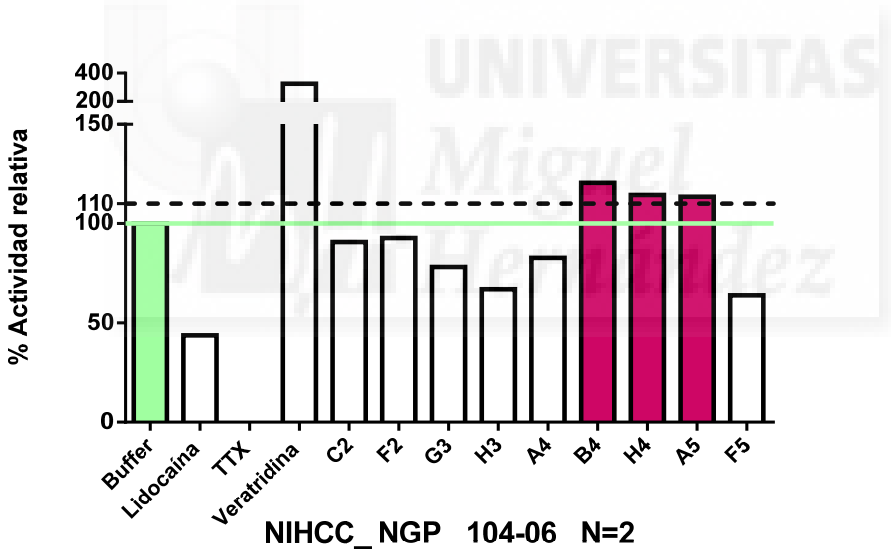


Candidatos N=3 : E2, G2, B3, B10

Figura AII- 12. Segunda vuelta para NGP 104-03 y NGP 104-04. “n2” para los potenciales activadores de las subseries 3 y 4 de la serie NGP-104, sobre HEKNav1.1wt.

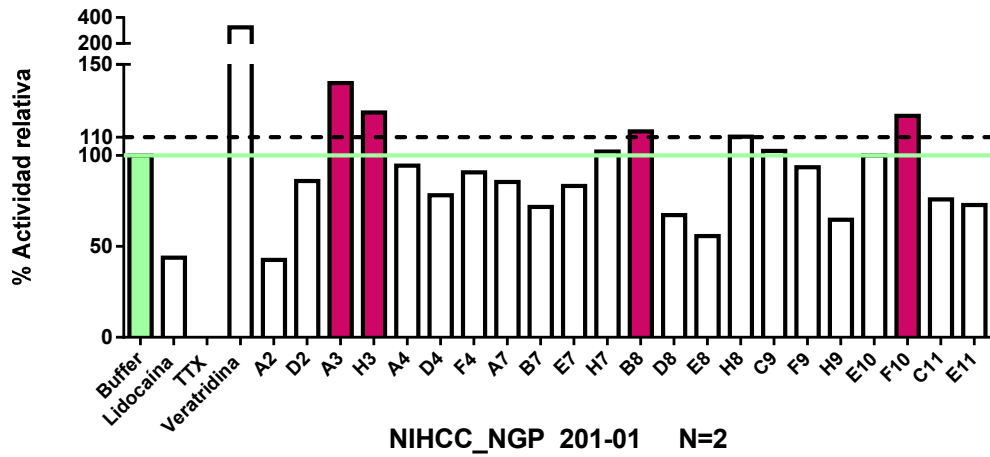


Candidatos N=3 : B4, F7, G8

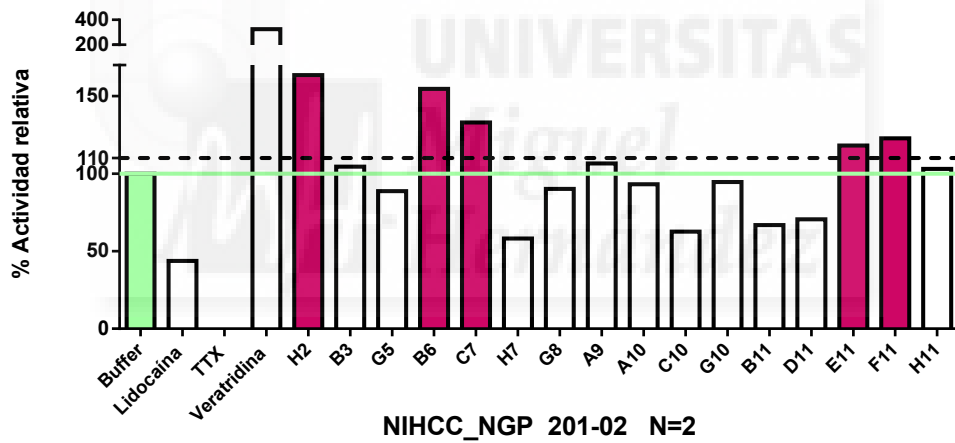


Candidatos N=3 : B4, H4, A5

Figura AII- 13. Segunda vuelta para NGP 104-05 y NGP 104-06. “n2” para los potenciales activadores de las subseries 5 y 6 de la serie NGP-104, sobre HEKNav1.1wt.

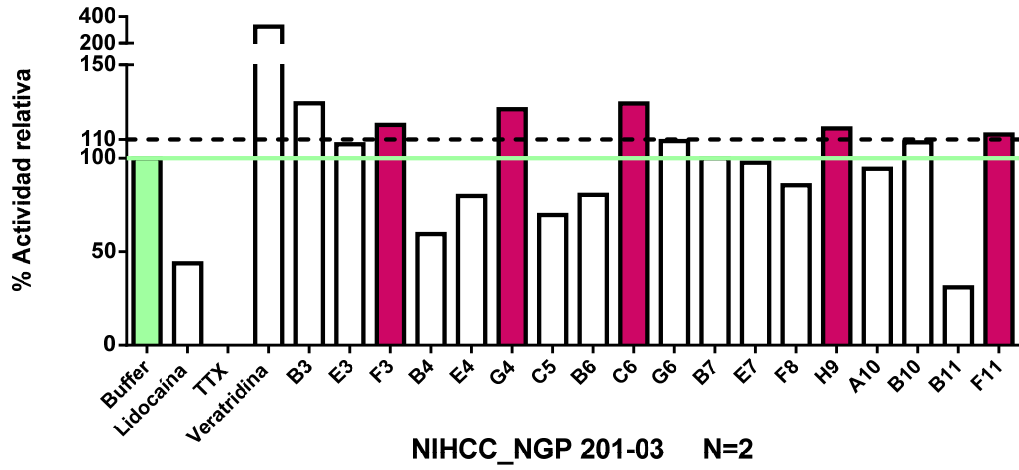


Candidatos N=3 : A3, H3, B8, F10

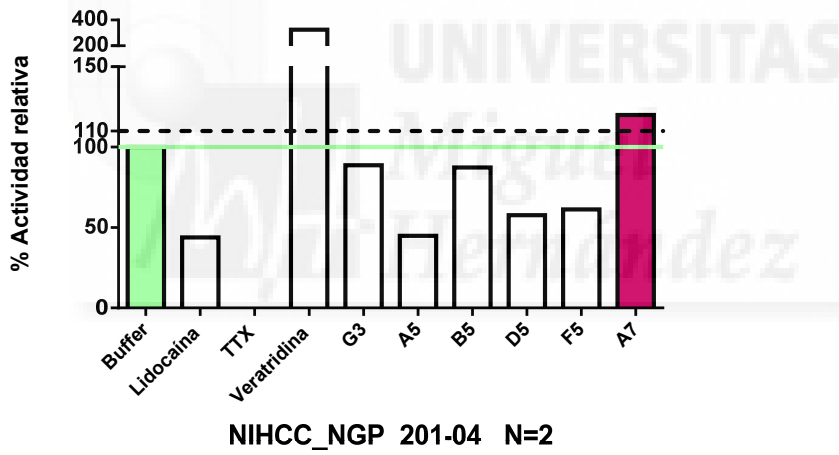


Candidatos N=3 : H2, B6, C7, E11, F11

Figura AII- 14. Segunda vuelta para NGP 201-01 y NGP 201-02. “n2” para los potenciales activadores de las subseries 1 y 2 de la serie NGP-201, sobre HEKNav1.1wt.



Candidatos N=3 : B3, F3, G4, C6, H9, F11



Candidatos N=3 : A7

Figura AII- 15. Segunda vuelta para NGP 201-03 y NGP 201-04. "n2" para los potenciales activadores de las subseries 3 y 4 de la serie NGP-201, sobre HEKNav1.1wt

Cribado de NIHCC, tercera vuelta

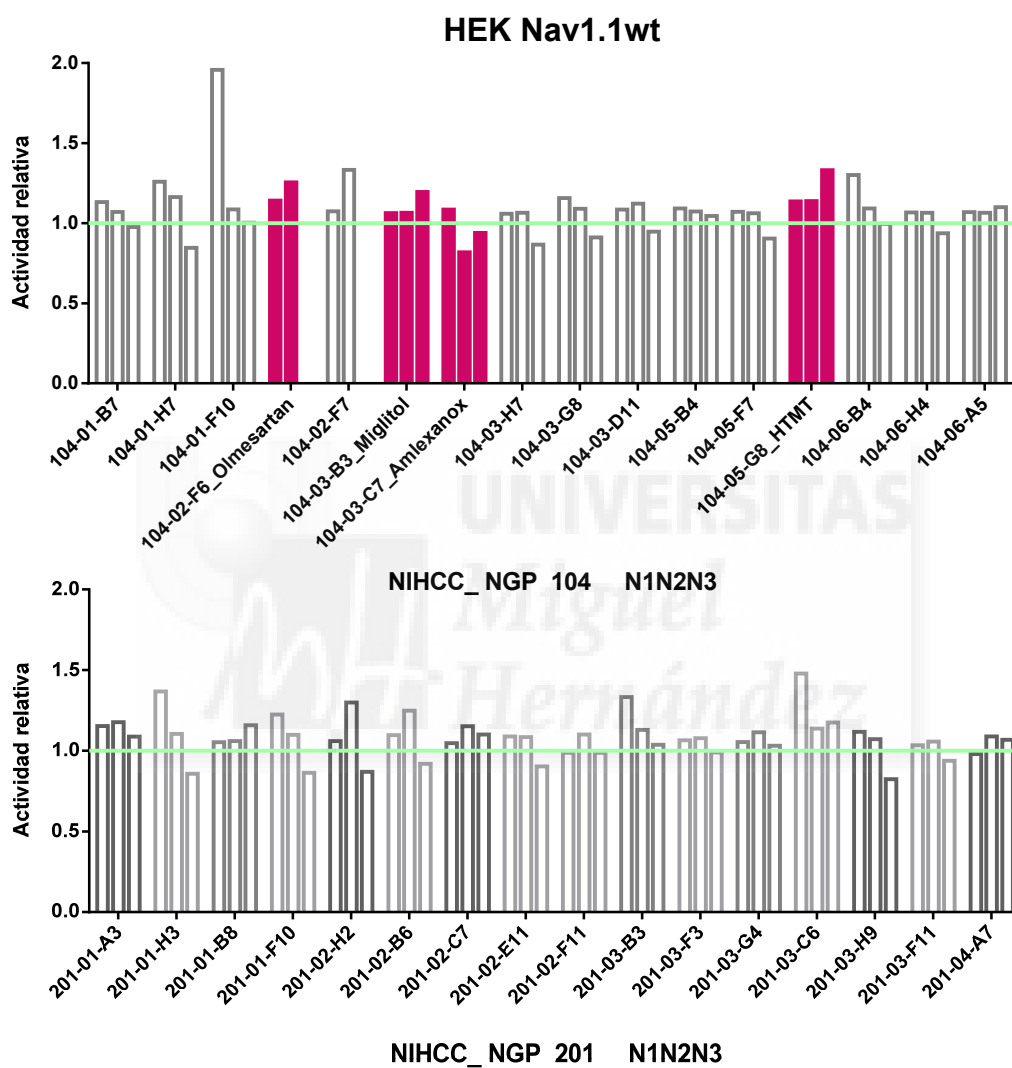


Figura AII- 16. Tercera vuelta para los potenciales activadores de Nav1.1. En la gráfica superior se muestran, en rosa, los 4 candidatos seleccionados con los resultados de las 3 vueltas excepto el Olmesartan con 2. De la serie NGP 201, abajo, no hubo ninguna molécula candidata.

Registros de corrientes de sodio con ambas líneas en presencia de los 4 candidatos de NIHCC.

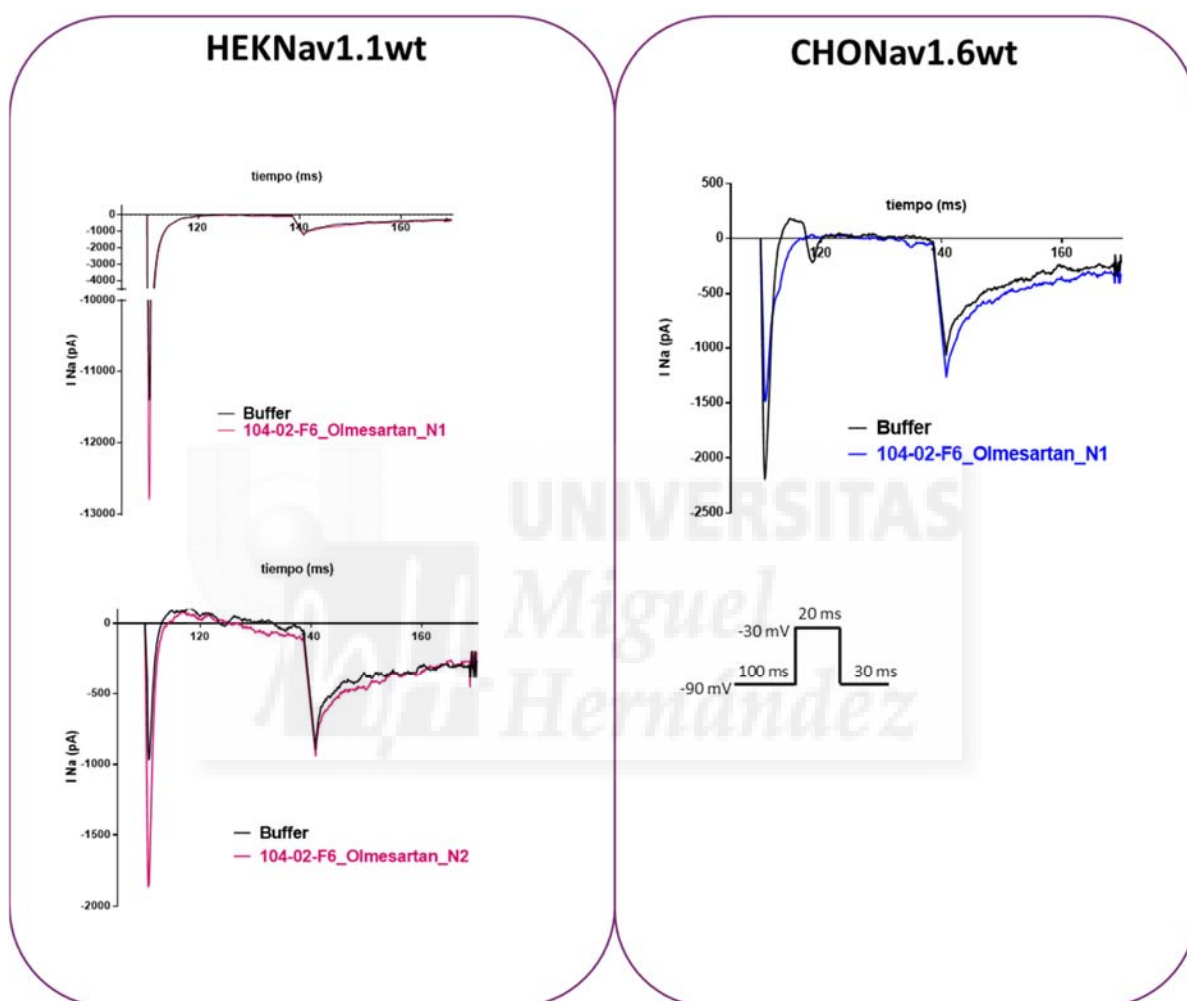


Figura AII- 17. Registros con Olmesartan. Únicamente se pudieron testar dos veces sobre HEKNav1.1wt y una sobre CHONav1.6wt, por falta del stock de la librería. Se muestra como aumenta el pico de corriente de Nav 1.1, en rosa, y como disminuye el pico en Nav1.6, en azul.

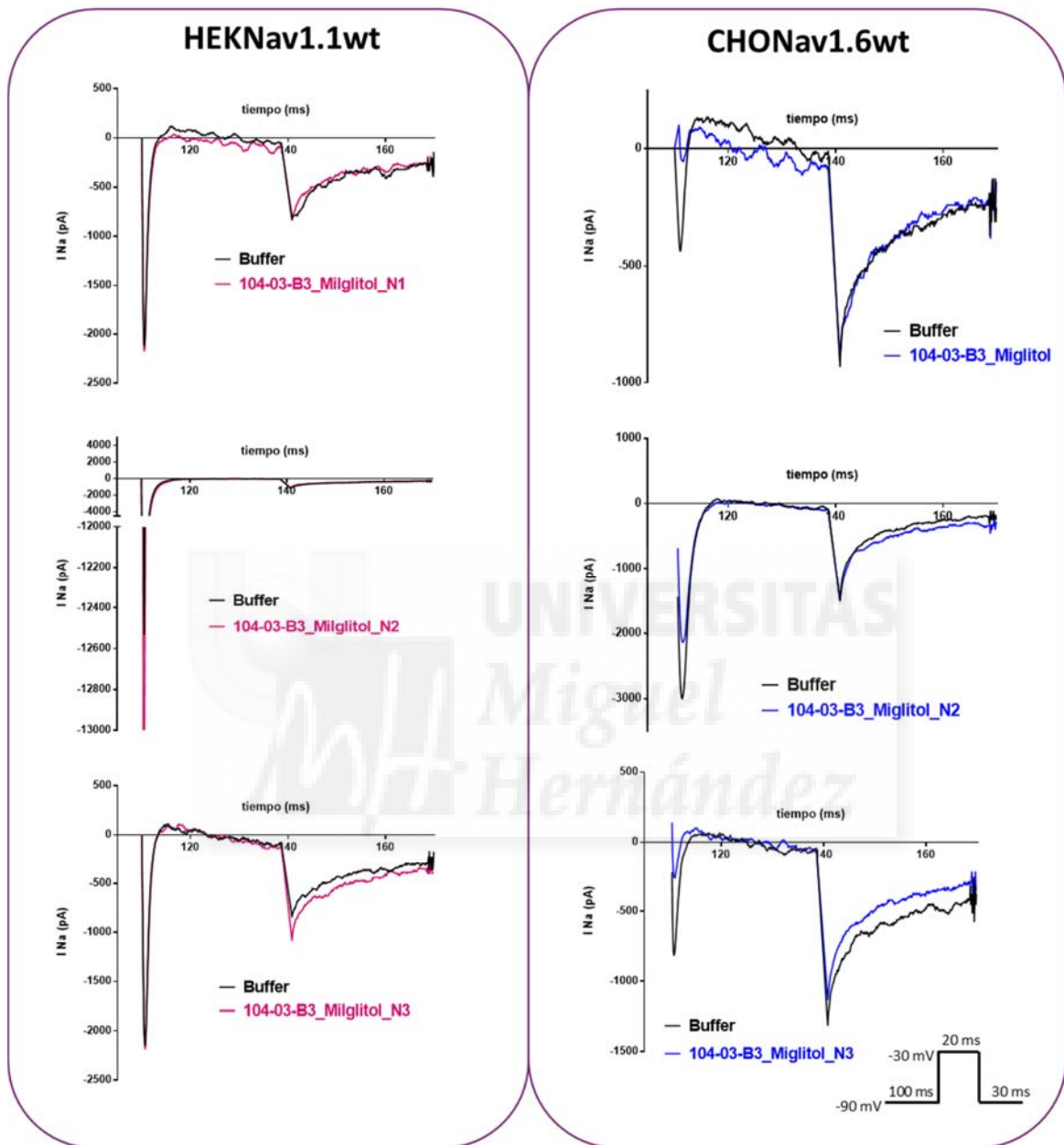


Figura AII- 18. Registros con Miglitol. Se muestra como aumenta el pico de corriente de Nav 1.1, en rosa, y como disminuye el pico en Nav1.6, en azul.

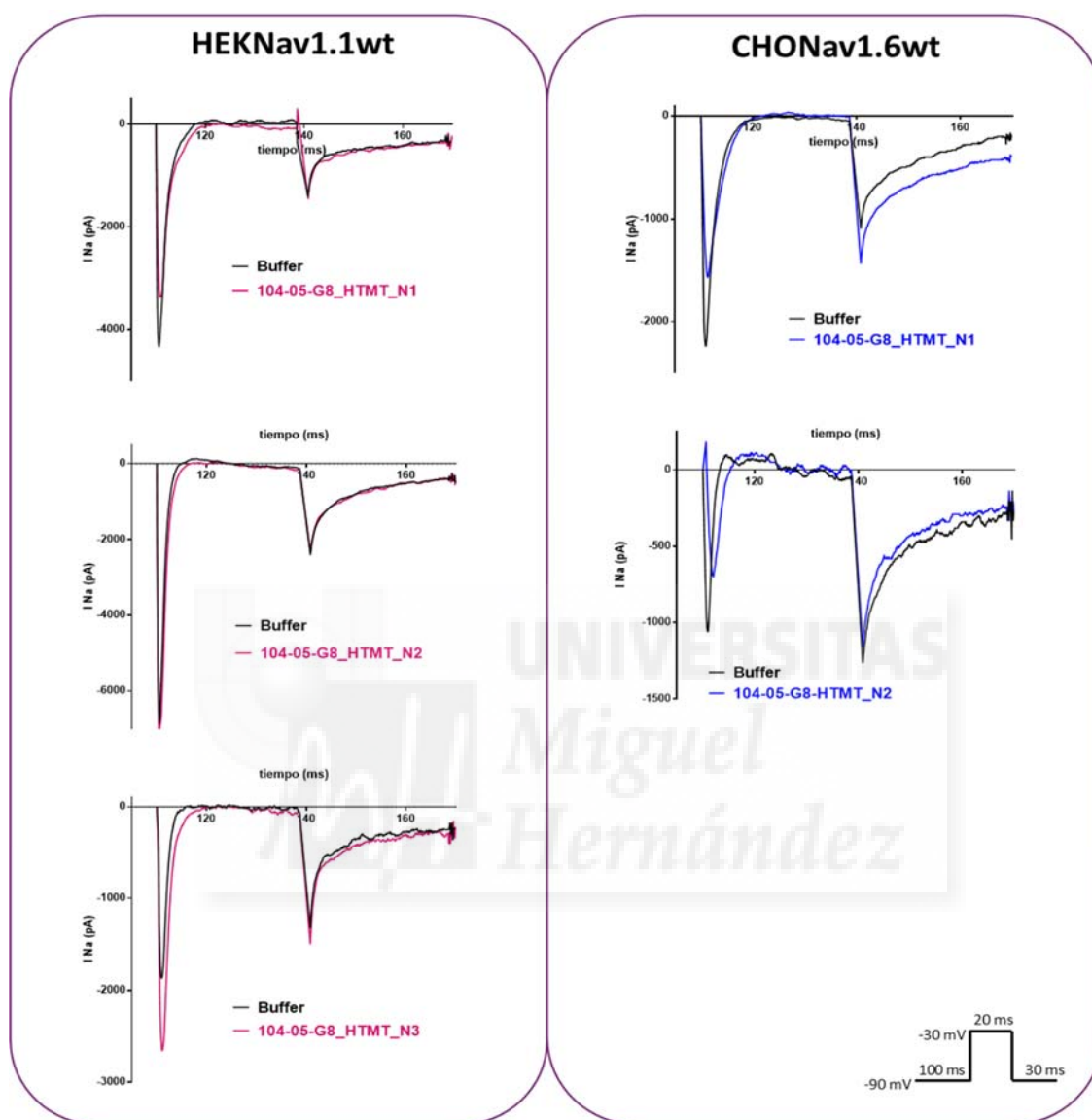


Figura AII- 20. Registros con HTMT. Se muestra como aumenta el pico de corriente de Nav 1.1, en rosa, y como disminuye el pico en Nav1.6, en azul.



“La ciencia siempre vale la pena porque sus descubrimientos, tarde o temprano, siempre se aplican”

Severo Ochoa



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, mi más sincero agradecimiento para D. Antonio Ferrer Montiel, director del Instituto de Biología Molecular y Celular, por haber confiado en mí desde mis años de estudiante de Bioquímica y haberme dado la oportunidad de seguir aprendiendo en sus laboratorios y elegirme, años más tarde, para desarrollar el maravilloso proyecto que ha dado lugar a esta tesis doctoral.

Mil gracias a D. Antonio Felipe Campo, que confió, casi a ciegas, en que yo era la persona indicada para poner mente y alma en su proyecto, gestado gracias a la curiosidad científica de su hija de 15 años. Por haber seguido creyendo en mí, en la distancia y valorar siempre mi criterio.

Millones de gracias a la Fundación Síndrome de Dravet, a Luis Miguel Arias, Julián Isla, Ana Mignorance y Marisol Montolio durante los primeros años, y a Chus Cuesta en la recta final de este camino. Me habéis hecho sentir parte importante de un gran reto, persiguiendo un sueño que es la cura para todos los niños con Síndrome de Dravet.

Gracias a los pequeños héroes y a sus familias, los verdaderos protagonistas de esta historia. Vosotros habéis sido mi motivación, mi ilusión y mi fuerza a pesar de las frustraciones que a menudo se sienten cuando las cosas que deseas con todo el corazón, van despacio. Pero así es la Ciencia, se va cocinando a fuego lento, y ojalá pronto se consiga el sueño que perseguimos, una cura para el Síndrome de Dravet. Ha sido una experiencia única e inolvidable, y la recompensa a algo por lo que llevo luchando toda mi vida, estudiar, aprender y trabajar para poner mi conocimiento al servicio de quien más lo necesita.

Todo empezó hace muchos, muchos años, viendo “Erasé una vez.....El cuerpo humano”Verdad mamá???? Una niña tan pequeña y ya tenía verdadera vocación por descubrir cómo funciona la vida.....Y así he construido mi historia.

Llegar hasta aquí ha sido un camino de muchos años, muchos cambios, mucho esfuerzo, muchos pequeños retos detrás de una gran meta, que me han dejado la vida repleta de momentos increíbles y personas maravillosas.

Muchas gracias a todos los que me habéis enseñado, apoyado y dado vuestro cariño en estos años en la UMH. Javi Esteban, me diste la gran oportunidad de comenzar en este mundo, nada más y nada menos que en el Karolinska Insitutet y con Irene! Gracias por ser mi mentor, mi tutor y mi amigo. Isa, Gregorio y Asia, os admiro como docentes, como compañeros y sobre todo como personas.

Crispy, mi hermanita, 20 años hace que te quiero. Químicas de la UVA siempre tendrá un lugar especial en mis recuerdos. Cuántas cosas hemos vivido, cuantas confesiones y cuantas nuevas experiencias nos quedan por compartir. A Vero, mi niña, que viniste a iluminarme con tu sonrisa y tu amor incondicional, te adoro. MariLuz, midiendo la densidad del barro en Fundamentos de Química Agrícola en Químicas de la UA, entraste en mi vida y ni se te ocurra irte!!! Ya sabes que tu presencia, aún a 3000 km, me hace muy feliz. Tú y tu preciosa familia siempre me habéis hecho sentir una más.

A todas esas personitas especiales que tanto quiero. Los de Valladolid, Álvaro, JC, Josito, que me habéis visto crecer y a pesar de la distancia nuestra amistad sigue ahí. Y a todos los que fueron mi familia desde que llegué a Benidorm, Dennis, Raúl, Sandra, Céline, Sara. Conseguisteis que no me sintiera tan lejos de casa.

A todas las personas que marcaron mi vida durante los años aprendiendo y ejerciendo Diagnóstico Clínico, a los profesores y a los compañeros, que recuerdo con mucho cariño. A los médicos, enfermeros y auxiliares del hospital, que me enseñaron y

me permitieron empaparme de una de mis pasiones. Y por hacer incluso agradables esas largas noches en urgencias. A Elena, mi recepcionista preferida, ahora gran psicóloga, cuántas horas estudiando, cuántas risas y que bonita amistad surgió.

Y a mi familia en Elche. Los de fuera de la universidad, Oscar, mi hermano de música, Etel, mi brujilla, Inés, lejos pero cerca. Gracias por ser tan auténticos.

Y por supuesto, a mis compañeros, mis amigos, mis confesores, los que me hacen reír, y los que me han hecho cabrear alguna vez, jajajaja.....Mis personitas del Lab. Ainara, contigo empezó todo en un email, allá por el 2008, te admiro y te quiero. Rober cp, mi pajarito, cuánto he aprendido contigo y cuántos abrazos cuando más lo necesitaba. Moni y Gema, mis profes de cultivos, mis maestras del laboratorio, mis niñas, os quiero mucho. A Raquel, tienes un corazón que no te cabe en el pecho, y soy muy afortunada de que estés en mi vida. Pier, Aarón, Luci, Rober sp, Nuri, Cloti, Olga, Wen, todo sabiduría, amor del bueno y risas. Maite, mucho ánimo cariño mio, que todo llega y eres una gran científica y un sol de persona. Antonio Zafra, mil gracias por estar siempre para echarme una mano! A los que ya han volado, Maria Grazia, Sakthi, os echamos de menos! A las nuevas generaciones, que me han dado tantos buenos momentos. Sergio, espero que la vida te devuelva toda la bondad que tu desprendes. Eva, ni se te ocurra dejar de hacerme reír! Laura, seré más feliz si sigues cerca de mí, Maggie, eres una crack y es genial cuando sonríes! Jan, Sara, David, acabáis de llegar y ya sois de la familia. A todo el grupo de la UB, también sois mis compis. A Sara, llegaste a mi casa para estar un mes y tú ya no te escapabas de mi vida.

A toda la secretaría del IBMC, los de antes, y los de ahora... ¿qué haríamos sin vosotros? May, Javier, Raquel, Carmen, Salvador, Ruth, Pepi.

¡Ilsa, Philipp, Cristina, Ana, Tania, Moni, millones de gracias haberme recibido con los brazos abiertos y hacer más fácil la locura de estos meses!!!

Y, por último, a mi familia, que, aunque estéis lejos, os siento cerca. Tere, Angel, Unai, Iván, Jess, Jone, Mario y las 3 peques que me tienen loca, y espero poder disfrutar más a partir de ahora, Alicia, Amaia y Nora. A mi abuelito, mi tía y mi abuelita, que me cuidan allá donde estén y siguen animándome y alentándome como lo hacían. A mi abuelito Vicente, sé que te hace mucha ilusión este libro, y con cariño te lo dedico.

A mi amor, que decidiste embarcarte en esta aventura, sin saber lo que te esperaba, jajaja. Te avisé...Escribir una tesis es algo muy duro!!! Aun así, Rulo y tú, os habéis quedado, me has apoyado, me habéis levantado en los momentos de frustración y agotamiento y lo hemos conseguido. Os quiero.

Y a los pilares de mi vida. Mi hermano, Diego, mi ejemplo a seguir, mi consejero, un torbellino de fuerza y bondad. Y a mis padres, ya que sin ellos nada de esto hubiera sido posible. Soy como soy porque es lo que me habéis enseñado. No tengo palabras para agradeceros que siempre hayáis confiado en mí, que hayáis creído en mi rebeldía, en mis sueños, en mis luchas. Esta tesis es vuestra. MIS AMORES