

Caracterización de inhibidores de la actividad de canales iónicos sensibles a voltaje.

Sensores de voltaje (fluorescentes) vs. Electrofisiología.

Estudiant: Laura Marcet Puig Grau en Biologia
Correu electrònic: lalamarcetpuig@gmail.com

Tutor: Antoni Benito Mundet
Cotutor: Israel Ramos Villullas
Empresa: Almirall S.A.

Vistiplau tutor (i cotutor*):

Nom del tutor:	Antoni Benito Mundet
Nom del cotutor:	Israel Ramos Villullas
Empresa / institució:	Almirall S.A.
Coreu electrònic:	antoni.benito@udg.edu israel.ramos@almirall.com

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació:

The aim of the development of these investigation's projects in Almirall is to find new molecules for a particular disease and it can get started in two different ways: the selection of a phenotype or of a protein targeting (GPCRs, enzymes, ion channels, etc.) whose modulation could become a benefit to a pathology of interest.

One of the proteins targeting that is currently raising more interest in the therapeutic investigation are the ion channels. The reason is that they play a critical role in the monitoring of many physiological processes. These processes form the molecular base of the nervous system, they also adjust the selective transport of the ions and macromolecules, they have a vital role in the synthesis of the mediators, they take part in the homeostasis and in the cellular communication. This project focus in the (VGSC). Nine sodium channels in humans have been identified and found nowadays that perform vital functions in the central nervous system and in the peripheral nervous system, as well. The dysfunction of these channels can create diseases which are called channelopathies such as the Brugada syndrome, childhood epilepsy or chronic pain.

Due to the required need in the discover of new drugs, the main objective of the study that was carried out for Almirall focused in the set-up of a new primary high-efficiency assay and minor costs than the electrophysiology using the platform FLIPR Tetra and monitoring the changes in the membrane potential, that could allow to characterize the power of new inhibitors of the sodium channel Nav1x. Once the set-up of the FLIPR Tetra was done, twenty-four inhibitors that were previously tested with the electrophysiology IonWorks quatro were characterized.

The results obtained with the FLIPR Tetra were in truth successful, the 87,5% being the most detected compounds in the same potency order than the electrophysiology. Moreover, the 75% of the detected compounds with a different potency order were more powerful than in the electrophysiology assay and the remaining 25% only seven times less powerful. This could assure its detection with the set-up assay. The controlling assay of the membrane potential using the FLIPR Tetra could be considered acceptable as a primary assay of characterization and narrowed down for specific inhibitors of the sodium channel Nav1.x, putting the electrophysiology as a activity-confirmation assay and characterization of inhibitors.

El desarrollo de los proyectos de investigación en Almirall tiene como objetivo encontrar nuevas moléculas de interés para una determinada enfermedad y puede iniciarse de dos formas distintas: la selección de un fenotipo o una diana terapéutica (GPCRs, enzimas, canales iónicos etc) cuya modulación sea beneficiosa respecto a una patología de interés.

Actualmente una de las *dianas* de mayor interés en la investigación terapéutica son los canales iónicos por su papel crucial en el control de muchos procesos fisiológicos. Estos constituyen la base molecular del sistema nervioso, regulan el transporte selectivo de iones y macromoléculas, tienen un papel importante en la síntesis de mediadores, intervienen en la homeostasis y la comunicación celular. Este estudio se centra en los (VGSC). En la actualidad se conocen y se han caracterizado nueve canales de sodio en humanos, estos realizan funciones importantes en el sistema nervioso central y periférico. La disfunción de estos canales puede producir enfermedades llamadas canalopatías como el síndrome de Brugada, epilepsia infantil o dolor crónico.

Debido al nivel de exigencia requerido en el descubrimiento de nuevos fármacos, el objetivo general del estudio realizado en Almirall se centró en la puesta a punto de un nuevo ensayo primario de mayor rendimiento y menor coste que la electrofisiología usando la plataforma FLIPR® Tetra y monitorizando cambios en el potencial de membrana, que permitiese caracterizar la potencia de nuevos inhibidores del canal de sodio Nav_{1.x}. Una vez realizada la puesta a punto de FLIPR® Tetra se caracterizaron veinticuatro inhibidores que se habían ensayado anteriormente con la plataforma de electrofisiología *IonWorks quatro*.

Los resultados obtenidos con FLIPR® Tetra fueron muy satisfactorios, siendo el 87.5% de los compuestos detectados en el mismo orden de potencia que la electrofisiología. Además, el 75% de los compuestos detectados con un orden de potencia diferente, fueron más potentes que en el ensayo de electrofisiología y el 25% restante solo 7 veces menos potente, pudiendo asegurar su detección con el ensayo puesto a punto. El ensayo de monitorización del potencial de membrana usando el FLIPR® Tetra puede considerarse por lo tanto, válido como ensayo primario de caracterización y cribado para inhibidores específicos del canal de sodio Nav_{1.x}, pasando la electrofisiología a ensayo de confirmación de actividad y caracterización de inhibidores.

La finalitat de desenvolupar els projectes d'investigació a l'empresa Almirall és la de trobar noves molècules d'interès per a una determinada malaltia i pot iniciar-se de dues maneres diferents: la selecció d'un fenotip o la d'una diana terapèutica (GPCRs, enzims, canals iònics, etc.), i que la modulació d'aquests sigui beneficiosa respecte a la patologia d'interès.

Actualment una de les dianes que genera més interès a la investigació terapèutica és la dels canals iònics pel seu paper crucial en el control de molts processos fisiològics. Aquests constitueixen la base molecular del sistema nerviós, regulen el transport selectiu d'ions i macromolècules, tenen un paper important a la síntesi de mediadors, intervenen en l'homeòstasi i la comunicació cel·lular. Aquest estudi se centra en els (VGSC). A l'actualitat es coneixen, i s'han definit, nou canals de sodi en humans. Els canals de sodi realitzen funcions importants al sistema nerviós central i perifèric, i la seva disfunció pot produir les malalties conegudes com a canalopaties, com per exemple el síndrome de Brugada, l'epilèpsia infantil o el dolor crònic.

A causa del nivell d'exigència requerit al descobriment de nous fàrmacs, l'objectiu general de l'estudi realitzat a Almirall es va centrar a la posada a punt d'un nou assaig primari de major rendiment i menys costós que l'electrofisiologia utilitzant la plataforma FLIPR[®] Tetra (*Fluorescent Imaging Plate Reader*). I monitoritzant els canvis al potencial de membrana es va permetre caracteritzar la potència de nous inhibidors del canal de sodi Nav_{1.x}. Un cop realitzada la posada a punt de FLIPR[®] Tetra es van caracteritzar vint-i-quatre inhibidors que s'havien assajat anteriorment amb la plataforma d'electrofisiologia *IonWorks quatro*.

Els resultats obtinguts amb FLIPR[®] Tetra van ser molt satisfactoris, sent el 87.5% dels compostos detectats al mateix ordre de potència que l'electrofisiologia. A més a més, el 75% dels compostos detectats amb un ordre de potència diferent van ser més potents que al assaig d'electrofisiologia i el 25% restant només va ser set vegades menys potent, podent assegurar així la seva detecció amb l'assaig de posada a punt. L'assaig de monitorització del potencial de membrana utilitzant el FLIPR[®] Tetra pot considerar-se, per tant, vàlid com a assaig primari de caracterització i cribratge per a inhibidors específics del canal de sodi Nav_{1.x}, passant l'electrofisiologia a assaig de confirmació de l'activitat i la caracterització d'inhibidors.

Quiero agradecer la oportunidad ofrecida por Almirall de participar en uno de los proyectos de I+D que se desarrolló en el departamento BRADS así como a mis compañeros y especialmente a mi tutor Israel Ramos por su paciencia y apoyo durante mi estancia. Ha sido una experiencia increíble.

Muchas gracias.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Canales iónicos.....	4
1.1.1. Función.....	4
1.1.2. Tipos	5
1.2. Canales de sodio operados por voltaje	5
1.2.1. Estructura general	6
1.2.2. Estados.....	7
1.2.2.1. Estado cerrado	7
1.2.2.2. Estado abierto	7
1.2.2.3. Estado inactivo rápido.....	7
1.2.2.4. Estado inactivo lento.....	8
1.3. Potencial de acción	8
1.4. Moduladores de los canales.....	9
1.4.1. Activadores	9
1.4.2. Inhibidores.....	10
1.5. Metodología de screening para el estudio de canales iónicos	10
1.5.1. Colorante Fluorescentes: marcadores de la MP sensibles al voltaje	10
1.5.1.1. Ensayo de fluorescencia	11
1.5.1.2. Ensayo de <i>Fluorescent energy resonance transfer</i> (FRET):.....	11
1.5.2. Electrofisiología	11
1.5.2.1. Atendiendo al grado de automatización.....	12
1.5.2.2. Atendiendo al parámetro de estudio.....	12
1.5.3. Fluorecence Image Plate Reader (FLIPR® Tetra)	12
2. OBJETIVES.....	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1. Reactivos, materiales y equipos	15
3.2. Métodos.....	16
3.2.1. Cultivo celular	16
3.2.2. Descongelación	16

3.2.3. Mantenimiento	16
3.2.4. Generación de stocks celulares	17
3.2.5. Compuestos	17
3.2.6. Descripción del ensayo de potencial de membrana	18
3.2.7. FLIPR® Tetra.....	18
3.2.8. Protocolos de electrofisiología	19
3.2.9. Cálculo de la potencia de los compuestos.....	19
3.2.9.1. Cinética.....	19
3.2.9.2. Cálculo de la IC50.....	20
3.2.9.3. Cálculo de EC50.....	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
4.1. Puesta a punto del ensayo	21
4.1.1. Optimización de la ventana de ensayo	21
4.1.1.1. Kit y tiempo de marcaje, densidad celular y concentración de veratridine.....	21
4.1.1.2. Ensayo en suspensión	23
4.1.1.3. Especificidad de la señal.....	24
4.1.1.4. Concentración de veratridine y el efecto del DMSO	25
4.2. Comparación de los resultados del FLIPR® Tetra y el PatchClamp.....	26
4.2.1. Potencia de los inhibidores	26
4.2.1.1. Comparación del ensayo de FLIPR con la electrofisiología (0,5% final de FBS).....	26
4.2.1.2. Efecto del suero en la potencia de los compuestos.....	28
4.2.2. Inhibidor P	28
5. CONCLUSIONES:.....	29
6. BIBLIOGRAFIA:	30

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Canales iónicos:

Los canales iónicos son proteínas transmembrana responsables de permitir el tránsito de iones, de un lado al otro de la membrana plasmática (MP). Estos, tienen dos propiedades fundamentales. La primera, es la capacidad de transición entre diferentes estados conformacionales o “*gating*” (Klint, Smith et al. 2015). La segunda es la conductancia, que se define como el mecanismo que permite el paso selectivo de iones, a favor de su gradiente electroquímico, o de otras moléculas, de un lado al otro de la MP.

Estas proteínas transmembrana, están compuestas por una o varias subunidades, iguales o diferentes, las cuales se disponen de manera que, en el centro queda una región hidrofílica que forma el poro del canal. Esta región suele estar formada por una secuencia de aminoácidos concreta, la cual otorga la especificidad del poro (Kaczorowski, McManus et al. 2008).

Los canales iónicos son selectivos y suelen tener preferencia por un ion por encima del resto (canales de calcio, potasio, cloro o sodio).⁽¹²⁾

1.1.1. Función:

Los canales iónicos tienen un papel crucial en el control de muchos procesos fisiológicos (Kaczorowski, McManus et al. 2008). Estos constituyen la base molecular del sistema nervioso, regulan el transporte selectivo de iones y macromoléculas, tienen un papel importante en la síntesis de mediadores, intervienen en la homeostasis, comunican las células para formar tejidos funcionales y pueden transportar toxinas letales. Hasta la fecha, han sido identificados más de 400 genes que codifican para canales iónicos en los humanos.⁽¹²⁾

Las alteraciones en el funcionamiento normal de los mismos, desencadenan las denominadas canalopatías (Tabla 1). Estas son las enfermedades causadas por algún defecto en los canales iónicos a nivel estructural, funcional o de expresión del canal (Kim 2014).

Tabla 1. Resumen de algunas canalopatías. La información para generar esta tabla proviene de los artículos (Klint, Smith et al. 2015) y (Kim 2014).

Enfermedad	Canal iónico afectado	Gen
Período de la epilepsia infantil	Nav1.2	SCN2A
Charcot-Marie-Tooth tipo 2C	proteína receptora transitorio de potencial en canales catiónicos, subfamilia V, miembro 4	TRPV4
Ataxias episodios tipo 1	Kv1.1	KCNA1
Ataxia espino celebrar tipo 6	Cav1.2: canal de calcio operado por voltaje	TRPV4
Síndrome de Brugada	Nav 1.5: canal de sodio operado por voltaje.	SCN5A
Diabetes mellitus transitoria neonatal	Kir 6.2	KCNJ11
Osteoporosis, autosómica dominante tipos 2	CIC-7: canal de cloro 7, operado por voltaje	CLCN7
Psíndrome de Liddle	Canal de sodio, no operado por voltaje 1	SCNN1B
síndrome largo QT, tipo 1	Kv7.1: canal de potasio operado por voltaje	KCNQ1
Indiferencia congénita al dolor, autosómica recesiva	Nav 1.7: canal de sódio operado por voltaje	SCN9A

1.1.2. Tipos:

Los canales iónicos pueden ser clasificados según el modo de activación del canal, la selectividad iónica (Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- o K^+) o sus características funcionales y estructurales.

A continuación se detalla la clasificación de los canales según el modo de activación.

Estímulos Químicos: Aquellos canales que requieren de un ligando, intracelular o extracelular, para ser activados. Es el caso de los canales Ach, L-Glu, Gly, etc.

Estímulos Físicos: Son activados por estímulos como el voltaje, la temperatura, la presión etc. Dentro de este grupo encontraríamos los canales de sodio operados por voltaje.

Polimodales: Son aquellos canales que pueden ser activados por distintos estímulos químicos y físicos. Este el caso de TRPA1 que puede ser activado por disminución de la temperatura, sustancias como la AITC, presión...

Sin estímulo: Son esas proteínas transmembrana, que se encuentran permanentemente abiertas y permiten el paso de iones, de un lado a otro, siendo constitutivamente activos, como es el caso de Enac.

En línea con la temática de este estudio, toda la información descrita a continuación se centra en los canales de sodio operados por voltaje.

1.2. Canales de sodio operados por voltaje:

Los canales de sodio operados por voltaje (Voltage gated Sodium channels VGSCs) se activan debido a cambios en el potencial de membrana y son los responsables de iniciar el potencial de acción (Klint, Smith et al.) (ver el apartado 3 página 10). Cuando llega un estímulo suficientemente intenso, la MP de la célula se depolariza, y los VGSCs se abren permitiendo el paso de los iones de Na^+ , desde el espacio extracelular hacia el espacio interno. Este proceso se produce durante la fase creciente del potencial de acción (Trivedi, Dekermendjian et al. 2008).

Las propiedades farmacológicas, biofísicas y la organización de los VGSCs en el genoma de los invertebrados son muy similares a la de los mamíferos, sugiriendo que el canal de sodio inicial fue establecido antes de que la evolución separara los vertebrados de los invertebrados (Frank and Catterall 2003).

Encontramos canales de sodio en todos los seres vivos, desde las bacterias hasta los humanos. Concretamente en humanos hay nueve subtipos que denominamos consecutivamente del Nav_{1.1} al Nav_{1.9} (Tabla 2) (King and Vetter 2014).

Tabla 2. Clasificación de las diferentes isoformas de VGSCs. La información para generar esta tabla proviene de los artículos (Jukic, Kikelj et al. 2014) y (Kaczorowski, McManus et al. 2008)

Canal	Gen	Patrón de expresión	Función
Nav _{1.1}	SCN1A	SNC	Dolor, Epilepsia y neurodegeneración
Nav _{1.2}	SCN2A	SNC	Neurodegeneración y epilepsia
Nav _{1.3}	SCN3A	SNC embrionario	Dolor
Nav _{1.4}	SCN4A	Musculatura esquelética	Miotónia
Nav _{1.5}	SCN5A	Corazón	Arritmia y QT largo
Nav _{1.6}	SCN8A	SNC, glía, GZD	Dolor y trastornos del movimiento
Nav _{1.7}	SCN9A	GZD, SNC	Dolor y trastornos neuroendocrino
Nav _{1.8}	SCN10A	GZD	Dolor
Nav _{1.9}	SCN11A	GZD	Dolor

SNC→ sistema nervioso central; GZD→ Ganglios de la zona dorsal; OC→ órgano circuloventricular

1.2.1. Estructura general:

Los VGSCs son complejos heteroméricos formados por la asociación de cuatro subunidades α de unos 260-KDa, a su vez asociadas a una o más subunidades β de 30 hasta 45 KDa (Jukic, Kikelj et al. 2014).

Todas las isoformas de los VGSCs comparten el mismo motivo estructural formado por las unidades α . Estas unidades, son las que forman el poro y el sensor de voltaje del canal (Figura 1). Las unidades β asociadas a las unidades α desempeñan un papel de modulador de la actividad del canal, ya que juegan un papel fundamental en la cinética del canal y en el "gating" dependiente de voltaje. En total se conocen 4 tipos de unidades β (Felix, Williams et al. 2004), en las que $\beta 1$ y $\beta 2$ tienen una asociación no covalente con la subunidad α , mientras que $\beta 3$ y $\beta 4$ presentan uniones disulfuro (Chen, Calhoun et al. 2012).

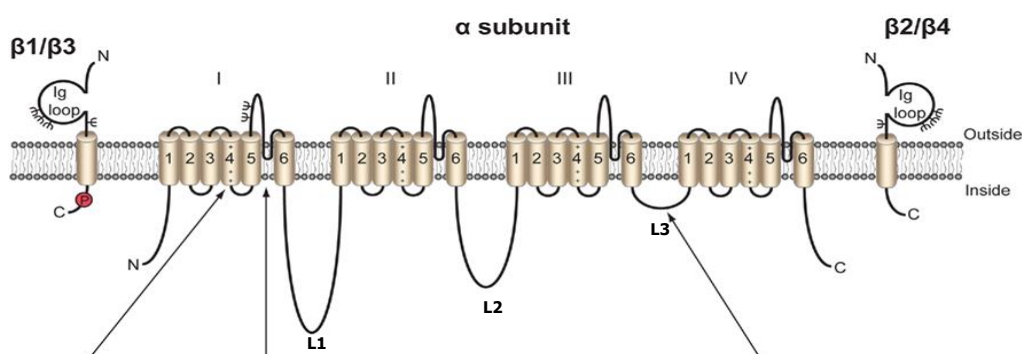


Figura 1. Esquema general de los canales de sodio. Imagen de (Brackenbury and Isom 2011).

Las diferentes unidades α están compuestas por una larga cadena polipeptídica (1,700-2,000 aminoácidos) la cual se pliega sobre sí misma formando cuatro dominios homólogos (I-IV) que se encuentran unidos entre sí por tres lazos (L1-L3). A su vez, cada dominio está formado por seis segmentos transmembrana (S1-S6). Las subunidades de la 1 a la 4 componen el dominio de detección de voltaje y las subunidades 5 y 6 juntamente con su unión extracelular, son las que constituyen la parte del poro del canal (Dib-Hajj, Yang et al. 2013). Las subunidades β tienen un dominio extracelular glicosilado y un único segmento transmembrana (Catterall 2000).

1.2.2. Estados:

Los canales de Sodio pueden estar en diferentes estados: Abierto, cerrado, inactivo lento o inactivo rápido (Zheng, Spencer et al. 2004) (Figura 2). El estado del canal dependerá de los cambios de voltaje que se produzcan en la MP.

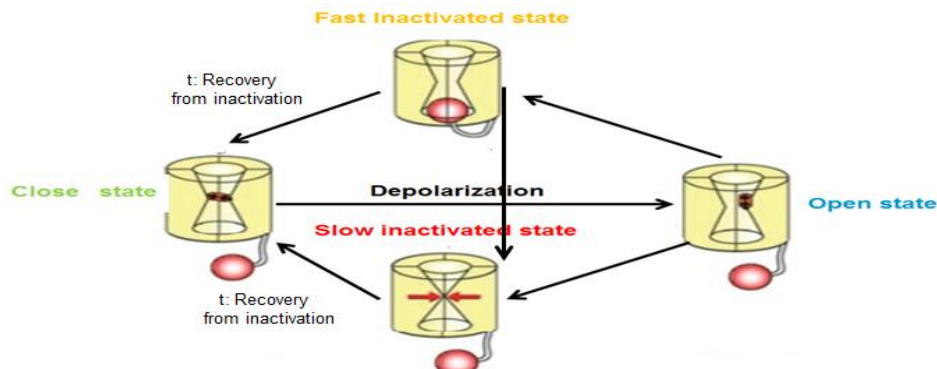


Figura 2. Esquema gráfico de las diferentes conformaciones de los VGSCs. Imagen de (Kelemen and Halász 2010).

Suponemos que un VGSC se encuentra en estado cerrado; cuando este recibe un estímulo suficiente para despolarizar la membrana, cambia su conformación y pasa a estado abierto, permitiendo el flujo de iones sodio del espacio extracelular, a favor de su gradiente electroquímico, al citoplasma. En condiciones normales, el VGSC, pasará del estado abierto al estado inactivo rápido. En este estado, la oclusión del poro se produce por un cierre mecánico en la parte interna de la célula por la acción de la partícula inactivadora y el tiempo de recuperación para volver al estado cerrado es pequeño. Si el canal ha sufrido una sobreestimulación, este pasará del estado abierto o del estado inactivo rápido, al estado inactivo lento. En este estado la oclusión del poro se produce por un cambio conformacional producido por la reestructuración del poro, y el tiempo de recuperación para volver al estado cerrado es superior que en el caso anterior. Cuando el VGSC se encuentra en alguno de los estados inactivos, no es capaz de responder a ningún estímulo.

1.2.2.1. Estado cerrado

En el estado cerrado, el canal no permite el flujo de iones de un lado al otro de la MP. Este se encuentra esperando a que llegue un estímulo para poder activarse. La oclusión del poro se produce por la acción de una compuerta formada por partes del mismo poro.

1.2.2.2. Estado abierto

Cuando la MP se despolariza por la llegada de un estímulo eléctrico suficiente para activar el VGSC, el poro se abre permitiendo la entrada de iones sodio a favor de gradiente electroquímico.

1.2.2.3. Estado inactivo rápido

Este tipo de inactivación se conoce como "ball-and-chain" debido a que se produce por la acción de una partícula inactivadora formada por los segmentos S4 y S5 intracelulares de los dominios III y IV del canal (ver, Figura 2. Esquema general de los canales de sodio pág. 8) (Goldin 2003).

Hay dos intereses biológicos principales de la inactivación rápida de los canales iónicos, el primero es cerrar momentáneamente el canal para evitar colapsar la célula, y al mismo tiempo darle un tiempo con el fin que reaccione al estímulo recibido. Por otra parte, el hecho que esta inactivación sea muy corta, permite asegurar que el canal estará preparado para recibir un nuevo estímulo lo antes posible.

1.2.2.4. Estado inactivo lento

En este tipo de inactivación no interviene la partícula inactivadora mencionada anteriormente. Se cree que este tipo de inactivación se produce por una reestructuración del poro, pero aún no se conoce como funciona exactamente (Goldin 2003).

Este tipo de inactivación se produce cuando el canal ha sufrido repetidas inactivaciones en un periodo corto de tiempo, o no le interesa recibir más estímulo. Como respuesta a un sobre estímulo, el canal pasa a estar en estado inactivo lento.

Un ejemplo de este tipo de inactivación ocurre en el dolor neuropático. Este es un trastorno neurológico en el que las personas experimentan dolor crónico intenso debido a un nervio dañado o a mutaciones en el canal. En este caso, el nervio recibe tantos estímulos seguidos, que los VGSCs, cambian su conformación a estado inactivo lento, para evitar responder a ellos y permanecer inactivo el mayor tiempo posible.

1.3. Potencial de acción:

El potencial de acción es un evento corto en duración, en el cual el potencial eléctrico de la MP rápidamente incrementa y disminuye (Figura 3). Los VGSCs son las proteínas clave para que se genere un potencial de acción (Károlyi, Lenkey et al. 2010).

Los potenciales de acción se dan en células excitables jugando un papel importante en la comunicación celular (impulso) o activación de procesos intracelulares (contracción muscular). A continuación se detallan las diferentes fases del potencial de acción así como algunas definiciones importantes para su comprensión.

Potencial de membrana [Vm]: es la consecuencia de la distribución irregular de los iones en ambos lados de la membrana. Cuando la célula está en reposo (potencial de reposo, PR), su valor suele encontrarse alrededor de -70mV, coincidiendo con el potencial de equilibrio del K⁺.

$$V_m = V_e - V_i$$

Siendo V_i el potencial intracelular y V_e el potencial extracelular.

Potencial umbral [PU]: No todos los estímulos eléctricos que llegan a la célula producen una respuesta, ya que existe un PU. Para que un estímulo sea capaz de generar un Potencial de acción, este debe generar una diferencia de voltaje que supere el PU.

Potencial de acción [PA]: es un cambio transitorio de la polaridad de la MP. Su duración depende del tipo celular, siendo en células de musculatura esquelética de 1 a 5 ms, en musculatura lisa de 10 a 50 ms y en el caso de neuronas mielinizadas inferior a 1 ms. Durante la 1ª fase, la MP tiene el PM positivo, causado por el flujo de iones que entran, del exterior al interior de la célula, gracias a los canales iónicos de sodio operados por voltaje.

Durante el proceso de repolarización, la célula trabaja para volver a recuperar el equilibrio en las concentraciones de iones a ambos lados de la MP. Este proceso (Figura. 3) se basa en el cierre de los VGSCs, la apertura de los canales de potasio operados por voltaje y el funcionamiento de la bomba sodio potasio. Cabe destacar que en musculatura cardiaca también participan los canales de Calcio dependientes de voltaje.

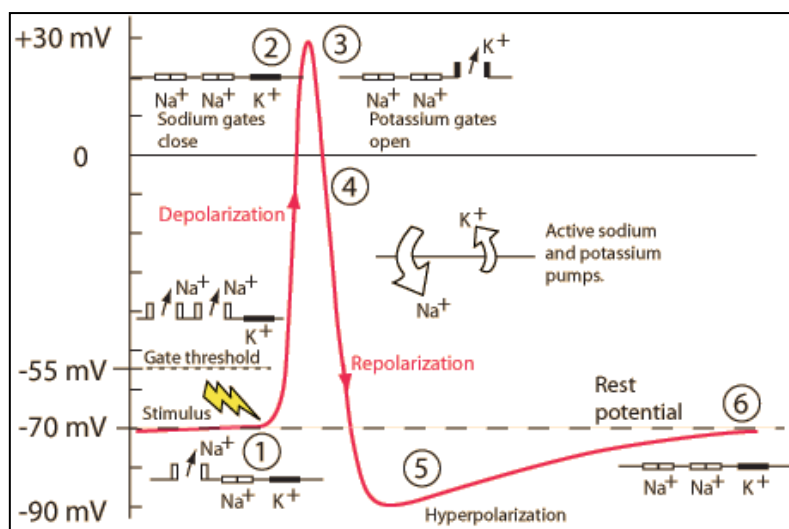


Figura 3. Esquema de las distintas fases del PA de una célula excitable. Imagen extraída de (Charand)

1) Se produce la apertura de los canales VGSCs causada por la llegada de un estímulo. 2) la célula ya se ha despolarizado y los VGSCs de cierran. 3) se abren los canales de potasio. 4) se activan las bombas de sodio potasio y continúa la repolarización. 5) la MP está híper polarizada y se encuentra en el periodo refractario. 6) la MP vuelve a estar en reposo, los VGSCs y los canales de potasio están en estado cerrado y listo para volver a recibir un estímulo.

1.4. Moduladores de los canales

Actualmente los VGSCs representan una rama importante de la investigación básica ya que están implicados en muchos procesos biológicos (Jukic, Kikelj et al. 2014). Muchos de los moduladores provienen de plantas y animales, además de los sintetizados por la industria farmacéutica.

1.4.1. Activadores

Además del estímulo al que los VGSC deben su nombre (voltaje), estos canales pueden ser activados mediante la unión directa de compuestos denominados agonistas.

Los agonistas son aquellos compuestos que estimulan la apertura o impiden el cierre del poro del canal. Este grupo de farmacos incluye alcaloides como Aconitine que proviene de la planta *Aconitum napellus*, GTX que se encuentra en los rododendros y otras plantas como la familia de los brezos, BTX que es secretada por la piel de la rana conocida como flecha colombiana y la veratridine, que proviene de plantas de la familia *Liliaceae* (Denac, Mevissen et al. 2000). Este último alcaloide es el agonista que emplearemos en los ensayos para este proyecto.

1.4.2. Inhibidores

Los inhibidores de VGSC son fármacos que actúan inhibiendo el paso del sodio a través del canal, retardan la velocidad y amplitud de la despolarización, reducen la excitabilidad y disminuyen la velocidad de conducción de la señal en el caso de las neuronas (Halford 2014).

Los inhibidores pueden causar distintos efectos: prevenir la excitación (anestésicos locales como la Lidocaina), regular la excitabilidad (antiarrítmicos como Propafenona) o prevenir la sobreexcitación del canal (antiepilépticos como la lacosamide y antiespasmódicos como Escopolamina) uniéndose al canal y manteniéndolo en una de las conformaciones inactivas (Károly, Lenkey et al. 2010).

Investigaciones recientes sugieren que los VGSCs de las neuronas sensoriales, son una buena diana para tratar el dolor crónico (King and Vetter 2014).

1.5. Metodología de *screening* para el estudio de canales iónicos

Los canales iónicos son importantes dianas en la investigación terapéutica. El aumento de la demanda en el rendimiento de la detección de su actividad, así como en la calidad de los ensayos de selección de compuestos moduladores de los canales iónicos, ha impulsado la innovación de técnicas de ensayo e instrumentación de detección en los últimos 10 años (Zheng and Kiss 2003).

Existen numerosas técnicas de detección para canales iónicos que están detalladas en la Tabla 3.

Tabla 3. Tecnologías de *screening* para canales iónicos

Tipo de ensayo	Throughput	Formato	¥ coste por pocillo	comentarios
Únion a membrana	Mediano / alto	*96 pocillos 384 pocillos (SPA)	Mediano / alto Mediano	Limitado por estructura y capacidad de unión del ligando. No funcional.
Electrofisiología (Ejemplos) - Manual Patch-Clamp - Ion Work HT - PatchXXpress 7000	Muy bajo Bajo/ mediano Bajo	*una sola célula *384 pocillos *16 pocillos	Muy alto Alto Muy alto	Clásica y estandarizada Baja resistencia de sellado (<GΩ) GΩ de sellado pero bajo rendimiento
Ensayo de flujo de iones - Radioisotopos(⁴⁵ Ca ⁺⁺ , ²² Na ⁺ , ⁸⁶ Rb ⁺) - Rb ensayo de flujo - Ca ²⁺ Dye fluorescente	Bajo Mediano Alto	*96 pocillos *96 / 384 pocillos *96 / 384 pocillos	Mediano Bajo Bajo / mediano	Bajo S/N ratio, no es apta para HTS Para canales de K ⁺ Limitado a canales de Ca ⁺⁺
Potencial de membrana - Fluorescencia - Basado en FRET	Alto Alto	96 / 384 pocillos *96 / 384 pocillos	Mediano / alto Bajo / mediano	IC ₅₀ despacada a la derecha en ciertos tipos de ensayo
*Ensayo heterogéneo (es necesario el lavado celular) ¥El coste por pocillo se calcula teniendo en cuenta el material fungible y los reactivos necesarios, basándonos en la máxima densidad de placa posible				

1.5.1. Colorante Fluorescentes: marcadores de la MP sensibles al voltaje

Los marcadores sensibles a voltaje, sirven para realizar el seguimiento de los cambios en el PM, debidos a la modulación de los canales iónicos expresados en la MP. Los cambios en el potencial de membrana son monitorizados indirectamente debido al cambio de fluorescencia provocado por los marcadores dependiendo del estado de la célula.

En las Figuras 4 y 5 se explican los ensayos más comunes de la industria farmacéutica usados para marcar la MP.

1.5.1.1. Ensayo de fluorescencia

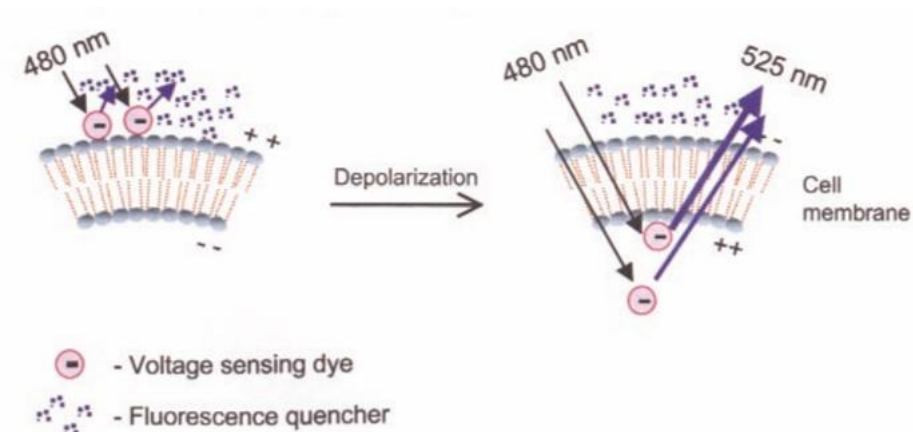


Figure 4: Basado en Fluorescencia (Kit Molecular devices)

Este tipo de *Kits* están compuestos por: sensores del voltaje con carga negativa (Oxonol) y desactivadores de fluorescencia o *quenchers*. La distribución de los sensores de voltaje está relacionada con el potencial de membrana. Cuando la célula está en PR estos tienden a situarse en la parte externa de la MP y la fluorescencia es absorbida por el *quencher*. Con la despolarización de la MP, los sensores del voltaje se mueven a la cara interna, aumentando la fluorescencia inicial en proporción a la actividad de los canales operados por voltaje. Los *quenchers* dejan de interferir en la fluorescencia.

1.5.1.2. Ensayo de *Fluorescent energy resonance transfer* (FRET):

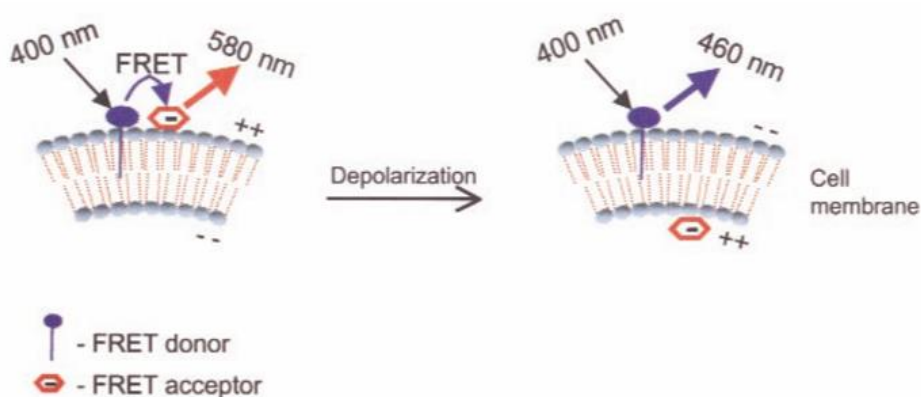


Figure 5: Basado en FRET

El *kit* de *FRET* incorpora dos componentes diferentes: el *FRET donor* y el *FRET acceptor*. El primero se encuentra unido a un fosfolípido que se integra en la parte externa de la MP; el segundo es un derivado del Oxonol y por lo tanto tiene carga negativa. Al igual que en caso expuesto anteriormente es necesaria la despolarización de la MP para que este se internalice. La estimulación del *FRET acceptor* depende de la excitación a 400 nm del *FRET donor* y la emisión final del *Kit* depende de la ubicación del *FRET acceptor*.

Esta *kit* de marcaje tienen tres inconvenientes destacables: el instrumental específico requerido y costoso; no es válido ni aplicable a todos los canales iónicos y; requiere dos lavados que limitan el rendimiento.

1.5.2. Electrofisiología

La electrofisiología es el estudio de las propiedades eléctricas de las células o los tejidos. Estos estudios se basan en las leyes básicas de la electricidad como la ley de Ohm.

$$V = \frac{I}{G}$$

V= voltios (v.)
I= intensidad (A)
G=conductancia (S), que es la inversa de la resistencia R.

Patch-clamp

El *patch-clamp* consiste en la medición, a tiempo real, de la actividad de los canales iónicos mediante la monitorización de los corrientes a través de los mismos. A continuación se detallan dos clasificaciones:

1.5.2.1. Atendiendo al grado de automatización

Manual patch-clamp

Esta técnica se basa en sujetar la célula con una micropipeta de cristal, haciendo un orificio por donde se introduce un electrodo. Este electrodo permite medir las corrientes iónicas que se producen en la célula por el flujo de iones a través de los canales iónicos. Está considerada como el *gold standard* de la técnica de Patch Clamp porque puede ser usada con todo tipo de canales iónicos, por su alta sensibilidad y porque permite realizar cuatro tipos de configuraciones distintos (Zheng and Kiss 2003):

- *Whole-cell*
- *inside-out*
- *outside-out*
- *cell-attached*

Automated patch-clamp

La automatización de este proceso, supone un aumento del *throughput* de la técnica convirtiéndola en la piedra angular de los ensayos de *screening* de canales iónicos. Actualmente, existen muchas plataformas automatizadas pero solamente son capaces de realizar ensayos *Whole-cell*. Estos se basan en el uso del *planar substrate* con el uso de placas, con agujeros en su base, donde se realiza la rotura de la MP (Zheng, Spencer et al. 2004).

1.5.2.2. Atendiendo al parámetro de estudio

Voltage-clamp

Consiste en fijar el voltaje al que se someten las células y medir la intensidad generada por el flujo de iones a través de los canales. Esta técnica se usa para el estudio del canal iónico de interés.

Current-clamp

Consiste en fijar la intensidad a la que se someten las células y medir el voltaje generado por el flujo de iones a través de los canales. Se usa para el estudio de los PA generados en las células.

1.5.3. Fluorescence Image Plate Reader (FLIPR® Tetra)

FLIPR® Tetra de *Molecular devices* es un sistema de cribado de alto rendimiento que se basa en la cuantificación de luminiscencia y/o fluorescencia en poblaciones celulares homogéneas. Gracias a su lector,

este instrumento es capaz de leer en intervalos inferiores a un segundo de forma simultánea en los 384 pocillos de una misma placa, por lo que reduce sustancialmente el tiempo de cribado y el coste de los ensayos. Este lector incorpora un pipeteador programable con un cabezal de 384 que permite la adición de compuestos durante las lecturas (FLUOFARMA 2013). También es destacable el mecanismo de atemperación del instrumento, permitiendo realizar lecturas de larga duración manteniendo las células en condiciones adecuadas. FLIPR es un instrumento usado principalmente para la realización de ensayos celulares donde la respuesta al estímulo es muy rápida como es el caso de ensayos de flujo de calcio, potencial de membrana etc.

El *software* que incorpora FLIPR® Tetra (*ScreenWorks*), permite evaluar los efectos de los compuestos sobre las células como lecturas independientes o realizar una cinética (Zheng, Spencer et al. 2004).

2. OBJETIVES

General purposes:

The fluorometric assays that detect changes in the PM have to be tested in order to replace the electrophysiology as a primary assay.

Specific purposes:

- Set-up of the assay for the sodium channels Nav_{1.x} of fluorescence with the FLIPR Tetra.
- To characterize the inhibitors of the sodium channels Nav_{1.x} using the fluorescence assay with the FLIPR Tetra.
- Comparison between the IC50 obtained with the FLIPR Tetra assay and with the ones obtained with the *PatchClamp*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En este apartado se nombran todos los reactivos, materiales, equipos y métodos necesarios para la realización del proyecto.

3.1. Reactivos, materiales y equipos

Reactivos	Materiales	Equipos
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Líneas celulares: <ul style="list-style-type: none"> ○ HEK 293 parentales. ○ HEK 293 con el canal Nav_{1.x} sobreexpresado. ➤ Medios de cultivo: ➤ DMEM/F12 (1:1) (1x) + GlutaMAX™ (Gibco, Ref.31331-028) complementado con un 10% FBS (Lonza, Ref. DE14-801F) y el 1% de Non-essential (SIGMA, Ref. M7145). ➤ Optimem (Gibco, Ref. 11058-021) complementado con un 1% de FBS (Lonza, Ref. DE14-801F). ➤ Medio de congelación: 45% DMEM/F12 (1:1) (1x) + GlutaMAX™ (Gibco, Ref.31331-028) completo + 45% FBS (Lonza, Ref. DE14-801F) + 10% DMSO (SIGMA, Ref. Su01571000). ➤ PBS (SIGMA, Ref. D8537). ➤ Antibiótico para el mantenimiento de las líneas celulares: Geneticina (Gibco, ref.10131-027). Dilución de uso 1/100 – (250µl en 25ml de medio). ➤ Tampón de ensayo y lavado: Dilución 1/10 de HBSS 10x (Gibco, Ref. 14065-049) + 10 mM Hepes (Hepes 1 M Ref. 83264-500ML-F). ➤ Para preparar 2 litros de Tampón de ensayo se utilizan 200 ml de HBSS10x, 20 ml de Hepes y 1.780 ml de agua milli Q. ➤ Agonista del canal: veratridine (SIGMA, Ref. V5754). ➤ DMSO (SIGMA Ref. Su01571000). ➤ Kit de Potencial de membrana <ul style="list-style-type: none"> ○ azul: (Molecular devices, Ref. R8042) ○ rojo: (Molecular devices, Ref. R8126) ➤ Compuestos sintetizados en Almirall en el departamento de química médica. ➤ TripLETM (Gipco, Ref. 12604-013). ➤ Trypan blue (SIGMA, Ref. T8154). 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Placa de células para ensayo: Placa Corning® CellBIND® 384 Well Plates (SIGMA, Ref. CLS3683-50EA). ➤ Placa de compuestos y veratridine: Placa natural® NUNC® 384 (SIGMA, Ref. P6616). ➤ Frascos: <ul style="list-style-type: none"> ○ 75cm² (Falcon®, Ref. 353136). ○ 175cm² (Falcon®, Ref. 353112). ➤ Falcons: <ul style="list-style-type: none"> ○ 50ml (Falcon® Ref. 352098). ○ 15ml (Falcon® Ref. 352097). ➤ Eppendorf: <ul style="list-style-type: none"> ○ 1,5ml (Eppendorf Ref. 0030 120.086). ➤ Criotubos 1,5ml (Thermo SCIENTIFIC, Ref.375418). 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Multicanal 384 (Thermo SCIENTIFIC) ➤ Incubador (Thermo SCIENTIFIC, hera CELL 240). ➤ FLIPR® Tetra (Molecular devices). ➤ AquaMax 4000 (Molecular devices). ➤ TECAN (Genesis, RSP 100). ➤ CyBi Well vario (CyBio®). ➤ Multidrop COMBI (Thermo SCIENTIFIC) ➤ Campana de Flujo laminar (TELSTAR, Bio-II-A/M). ➤ Contador de células Automatizado TC20TM (BIO-RAD Ref. 145-0001).

3.2. Métodos

3.2.1. Cultivo celular

El mantenimiento de las líneas celulares HEK 293 parentales, así como la HEK 293 con el canal Nav_{1.x} sobreexpresado, se llevó a cabo siguiendo las indicaciones de la casa comercial y utilizando como medio de cultivo el DMEM/F12 completo (composición del medio, ver 4.1.) en el caso de la línea celular con el canal Nav_{1.x} sobreexpresado, el medio se completó con geneticina como antibiótico de selección. En la Figura 6 se ven las dos líneas celulares después de estar 3 días en cultivo.

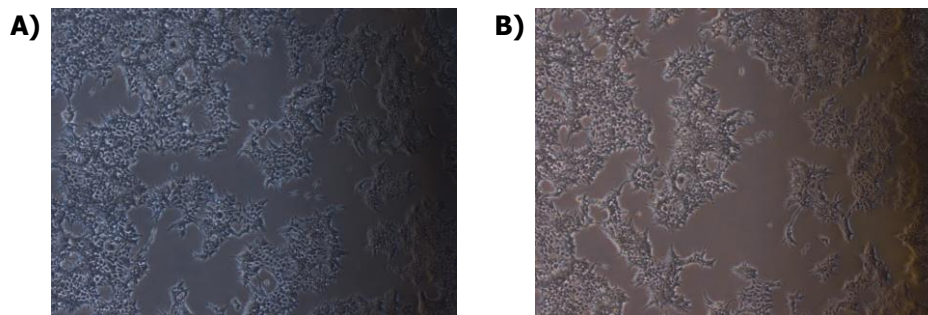


Figura 6. Imágenes a 4x en el microscopio.

Células a un 60% de confluencia, en un flasco de 175 cm², sembradas en medio DMEM/F12 completo. A) Células HEK 293 parentales
B) Células HEK 293 con el canal Nav_{1.x} sobreexpresado.

A continuación se detalla el proceso de manipulación desde la descongelación, el mantenimiento, la siembra de placas de ensayo hasta la generación de stocks celulares.

3.2.2. Descongelación

Los criotubos de células provenientes de la casa comercial, se descongelaron a 37°C. Seguidamente, se traspasó el contenido del criotubo a un falcon de 15ml que contenía medio completo.

A continuación se centrifugó a 800 r.p.m. durante 4 minutos, con la finalidad de eliminar el medio de congelación y resuspender el sedimento en medio completo nuevo. Posteriormente se cuantificó la concentración y la viabilidad celular de la dilución obtenida. Para ello se utilizó el Contador de células Automatizado TC20™ y el Trypan-blue. Finalmente, a partir de la disolución de células, se sembraron flascos de 75cm² para el mantenimiento celular, a una concentración de 1,5.000.000 de células/flascón, en 15 ml de medio completo y presencia de Geneticina. Los flascos se dejaron en el incubador a 37°C al 5% de CO₂.

3.2.3. Mantenimiento

El mantenimiento de las dos líneas celulares se realizó en flascos de 175cm², que contenían 25ml de DMEM/F12 complementado con Geneticina en el caso de las células recombinantes. Toda la parte de manipulación celular, se realizó dentro de la cabina de flujo laminar situada en la sala de cultivos, en

condiciones estériles. La casa comercial recomienda que las células se encuentren a una confluencia mínima del 60% y máxima del 80%, para ser pasadas a un nuevo flascón.

Con este fin, se trabajó con tres densidades distintas: 3,7.000.000 de células/flascón para dos días, 2,3.000.000 de células/flascón para tres días y 0,5.000.000 de células/flascón en el caso de estar 4 días en el incubador. Durante el proceso de crecimiento, el medio de los flascos se cambiaba cada dos días.

Seguidamente se presenta el tratamiento al que se sometían las células que presentaban una confluencia idónea:

- a) Aspirar medio de cultivo del flascón.
- b) Lavar con PBS y retirar el PBS con ayuda del vacío.
- c) Levantar la monocapa de células del flascón añadiendo TripLE, durante 2 minutos en el incubador.
- d) Añadir medio DMEM/F12 completo y recuperar las células en un falcon.
- e) Centrifugar falcon a 800 r.p.m. durante 5 minutos.
- f) Descartar el sobrenadante, resuspender el sedimento con medio nuevo y a partir de la disolución obtenida calcular la concentración y la viabilidad de esta utilizando el Contador de células Automatizado TC20™ y el Trypan-blue.
- g) Sembrar el flascón a la concentración deseada en medio completo y con Geneticina como antibiótico.
- h) Dejar flascos en el incubador a 37°C, al 5% de CO₂.

3.2.4. Generación de stocks celulares

El proceso de tratado de los flascos dedicados a la generación de *stocks*, desde el lavado con PBS, hasta el proceso de centrifugación (procedimiento detallado en el apartado 4.2.3.).

Después de descartar el sobrenadante del falcon centrifugado, se resuspendía el sedimento con medio de congelación (composición ver apartado 4.1.) generando una dilución con una concentración de 8.000.000 de células/ml. Las alícuotas generadas en criotubos de 1 ml, se depositaron en el congelador a -80°C, durante un día y se traspararon al contenedor de N₂ líquido, excepto los viales generados para ensayos con células congeladas.

3.2.5. Compuestos

Los compuestos utilizados en los distintos ensayos, se encuentran almacenados en forma de polvo en el Lasario, que es el espacio dedicado al almacenamiento de productos y compuestos en Almirall.

Todos los compuestos fueron disueltos en DMSO 100% a una concentración final de 10 mM, excepto la veratridine cuyo stock fue de 57mM. A partir de la disolución obtenida inicialmente, se generaron alícuotas que se almacenaron a -20°C.

Durante la manipulación de la veratridine, se trabajó con especial atención, ya que esta sustancia es muy tóxica. Al margen de las precauciones habituales en el manejo de cualquier compuesto, cabe destacar:

- Manipulación de la veratridine en polvo: doble par de guantes y mascara de carbono activo.
- Manipulación de la veratridine en estado líquido: abrir los recipientes dentro de una campana.

3.2.6. Descripción del ensayo de potencial de membrana

El día antes del ensayo, las células que sobreexpresan el canal Nav_{1,x} son sembradas en las placas Corning de 384 pocillos (25µl por pocillo) con una multicanal e incubadas a 37°C y un 5% de CO₂ *Over night* (proceso manipulación de las células, ver apartado 4.2.3.). Las densidades celulares y los medios de cultivo usados, se especifican en el apartado de puesta a punto del ensayo dentro de resultados. (ver apartado 5.1.1.1.).

El día de ensayo, se saca la placa de células del incubador y se deja atemperar, durante 15 minutos, a temperatura ambiente. Pasados los 15 minutos, se marcan las células con el fluoroforo oxonol (20µl por pocillo), previamente disuelto en 8ml de tampón de ensayo (ver la composición del tampón en el apartado 4.1.), a la concentración especificada en el *kit* de *Molecular devices*.

Dado que el marcaje celular es otro de los puntos a optimizar, tanto el tiempo como el tipo de colorante, los encontramos especificados dentro del apartado de resultados, (ver apartado, 5.1.1.1.). En paralelo al proceso de marcaje se preparan las placas de compuestos. El primer paso consiste en dispensar DMSO 100% en toda una placa natural[®] NUNC[®] de 384, exceptuando las columnas 3 y 13 donde van los inhibidores. Con la ayuda del TECAN, se realiza el banco de diluciones seriadas deseadas.

A continuación se transfiere 1µl de la placa de inhibidores, a otra placa natural[®] NUNC[®] de 384 pocillos, que contiene 50µl de tampón de ensayo por pocillo. Este último paso se realiza con el CyBio Well vario.

Transcurrido el tiempo de marcaje celular correspondiente, las células son preincubadas durante 15 minutos con los inhibidores a testar (son los expuestos en la Tabla 9 del apartado 5.2.), tras los cuales se procede a la activación del canal iónico mediante la adición de veratridine.

Dado que la concentración de veratridine es otro punto de optimización del ensayo, se encuentra especificada en el apartado de resultados (ver apartado, 5.1.1.1.).

3.2.7. FLIPR[®] Tetra

Tanto la adición de los compuestos como la de veratridine a la placa de células, las realiza el FLIPR[®] Tetra siguiendo los protocolos detallados en la Tabla 4.

Tabla 4. Resumen protocolos de FLIPR[®] Tetra utilizados en los ensayos de potencial de membrana para el canal Nav_{1,x}

Settings de los protocolos del FLIPR [®]		
comunes en los dos protocolos	Protocolo: Nav _{one} addition compound 5µl	Protocolo: Nav _{1,x} Veratridine
λ Excitación (nm): 510-545 λ Emisión (nm): 565-625 Gain: 1	Los 10 primeros segundos lectura de la línea base.	Los 10 primeros segundos lectura de la línea base.
Exp. Time (s): 0.10 EXC Intensity (%): 50 Gate Open (%): N/A	Adición de 5µl de compuesto y lectura durante 15 minutos.	Adición de 12,5µl de compuesto y lectura durante 15 minutos.

3.2.8. Protocolos de electrofisiología

Los protocolos de electrofisiología utilizados en este proyecto no se especifican debido a que son confidenciales.

3.2.9. Cálculo de la potencia de los compuestos

La potencia de un compuesto es la manera de expresar su actividad refiriéndose a la concentración necesaria del mismo para producir un efecto determinado. Con el fin de calcular los parámetros mencionados a continuación, se exportan los datos crudos obtenidos del FLIPR® Tetra a partir del *software* que incorpora (*ScreenWorks*) y se trabajan en distintas hojas de cálculo de *Excel* según convenga.

A continuación se detallan los parámetros y los programas utilizados durante el análisis de datos en este trabajo.

3.2.9.1. Cinética

Los resultados obtenidos con los ensayos de FLIPR® Tetra son las cinéticas de los distintos tratamientos. Como se puede ver en la Figura 7, en la parte izquierda de la pantalla del programa podemos trabajar con las cinéticas de los tratamientos de interés, previamente seleccionados en la parte derecha de la pantalla que corresponde a los 384 pocillos de una placa.

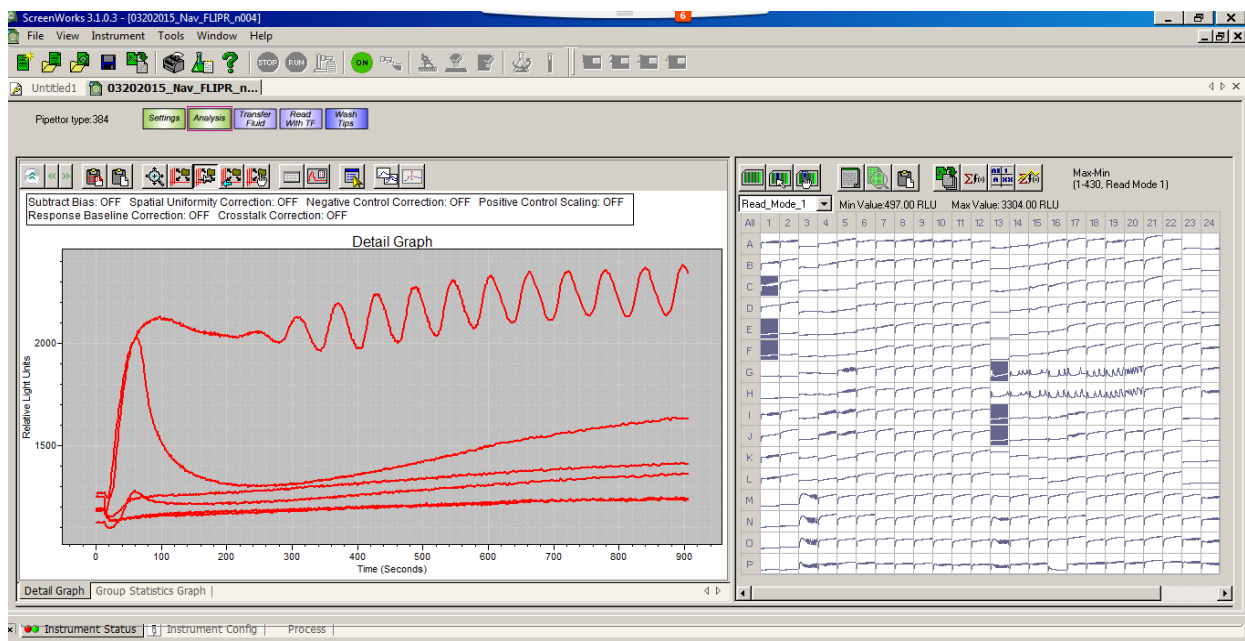


Figura 7. Pantalla de *software* ScreenWorks con los resultados de un ensayo de FLIPR® Tetra.

Seguidamente se procede a determinar la línea base y el máximo de la señal definiendo distintos intervalos temporales y operaciones según el comportamiento del ensayo. Como se observa en la Figura 8, para poder calcular la ratio de cada pocillo, se necesita exportar el máximo y la línea base de cada uno.

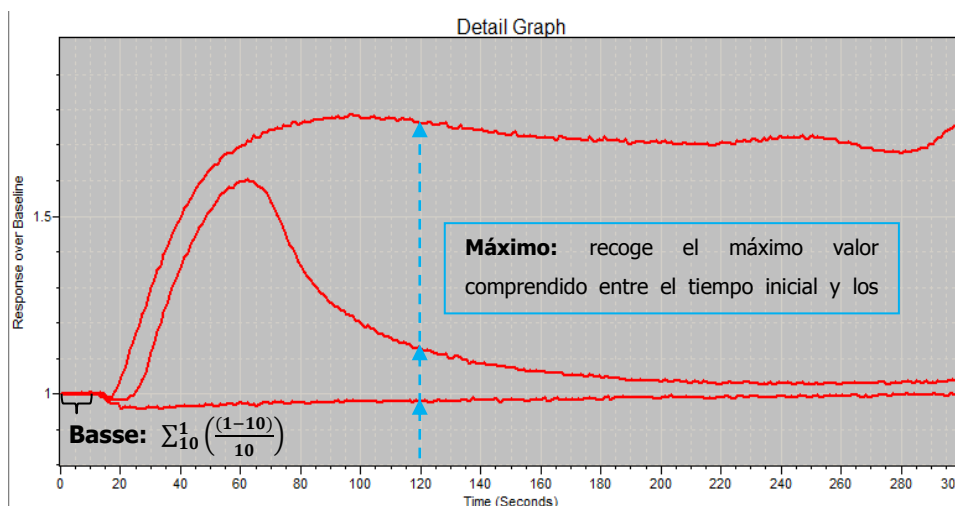


Figura 8. Esquema de cálculos de parámetros exportados desde el *software ScreenWorks* del FLIPR® Tetra.

La ratio se realiza con una hoja de cálculo de Excel y es el resultado del cociente del máximo entre la línea base. Con el fin de poder calcular la IC₅₀ de los compuestos, previamente se calcula el porcentaje de inhibición aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{inhibición} = 100 - \left(\frac{\text{ratio compuesto} - \text{ratio línea base}}{\text{ratio total} - \text{ratio basal}} \times 100 \right)$$

Ratio compuesto = máxima señal en presencia de inhibidor y activador

Ratio total = máxima señal en ausencia de inhibidor

Ratio basal = Máxima señal en ausencia de activador

Observamos que pasados los 260 segundos de lectura con el FLIPR® Tetra aparecían unas ondas en las cinéticas de los compuestos Figura 7. Estas ondas desaparecían cuanto mayor era el número de pase de las células. Suponemos que las ondas representan varios PA y el constante intento de la célula para repolarizarse, por lo que cuando estas desaparecían nos estaba indicando un posible deterioro de las células.

3.2.9.2. Cálculo de la IC50

Para determinar la potencia de un inhibidor el parámetro que se calcula es la IC₅₀, siendo la concentración molar del compuesto que disminuye un 50% la respuesta de la diana conocida. Este cálculo se realiza con una hoja de cálculo de Excel asociada al software *Activity Base*.

3.2.9.3. Cálculo de EC50

La EC₅₀ es la concentración de un agonista que induce la mitad de respuesta de la diana respecto a su máxima actividad. Este cálculo se realizó con el programa de cálculo *Graphpad prism 6*.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados se dividen en tres apartados, la puesta a punto del ensayo, la caracterización de inhibidores de los VGSCs y la comparación de los resultados obtenidos en el FLIPR® Tetra con los de *PatchClamp* de la base de datos interna de Almirall.

4.1. Puesta a punto del ensayo

Antes de empezar con la caracterización de los inhibidores de los VGSCs, se realizaron diversos ensayos con el fin de optimizar y establecer las condiciones experimentales idóneas. También se procedió a la optimización de la ventana de ensayo, entendiendo por ventana de ensayo el cociente entre la señal máxima y el basal.

4.1.1. Optimización de la ventana de ensayo

La finalidad de estos estudios fue definir las condiciones de ensayo óptimas teniendo en cuenta: Densidad celular, tipo de sembrado de las células (adheridas o en suspensión), tipo de Kit de marcaje (Rojo o Azul) y tiempo de marcaje, concentración de veratridine (agonista), medio de cultivo de siembra para ensayo, lavar o no las células antes del ensayo y porcentaje de DMSO final por pocillo.

4.1.1.1. Kit y tiempo de marcaje, densidad celular y concentración de veratridine

Con el fin de evaluar la factibilidad del ensayo de potencial de membrana, se procedió a la realización de una matriz en la que se testaron tres densidades celulares (10.000, 15.000 y 20.000 células por pocillo), cuatro concentraciones distintas de veratridine final (50µM, 16,7µM, 5,5µM, 0µM) y cuatro tiempos distintos de marcaje (15, 30, 45, 60 minutos) usando los dos kits de marcaje (Azul y rojo) ver Tabla 5 y Figura 9.

Los ensayos se realizaron con células adheridas lavando (Tabla 5) y sin lavar (Tabla 6). (Proceso experimental ver el apartado 4.2.6.).

Tabla 5. Resultados de la matriz con los distintos parámetros ensayados, lavando la placa con el Aquamax 4000.

		10.000 células				15.000 células				20.000 células			
		15 min	30 min	45 min	60 min	15 min	30 min	45 min	60 min	15 min	30 min	45 min	60 min
Colorante rojo	50µM	\bar{X} 1,790	1,825	1,946	2,065	1,884	1,878	2,011	2,061	1,900	1,945	2,008	2,035
		\pm SD	0,271	0,104	0,069	0,092	0,053	0,035	0,105	0,089	0,100	0,062	0,104
	16,7µM	\bar{X} 1,558	1,718	1,725	1,760	1,664	1,635	1,650	1,646	1,648	1,645	1,640	1,639
		\pm SD	0,010	0,033	0,024	0,044	0,022	0,022	0,014	0,018	0,019	0,041	0,041
Colorante azul	5,5µM	\bar{X} 1,168	1,293	1,271	1,283	1,245	1,259	1,265	1,216	1,281	1,254	1,231	1,205
		\pm SD	0,012	0,028	0,019	0,013	0,024	0,046	0,018	0,013	0,018	0,076	0,076
	0 µM	\bar{X} 1,003	0,991	1,001	0,994	0,993	0,998	0,999	1,003	1,001	0,999	0,998	1,003
		\pm SD	0,013	0,009	0,010	0,005	0,014	0,007	0,005	0,005	0,005	0,003	0,007
Colorante rojo	50µM	\bar{X} 1,515	1,370	1,315	1,241	1,600	1,436	1,390	1,293	1,636	1,476	1,395	1,285
		\pm SD	0,026	0,022	0,029	0,035	0,021	0,038	0,027	0,051	0,042	0,033	0,022
	16,7µM	\bar{X} 1,253	1,128	1,071	1,031	1,333	1,161	1,119	1,049	1,365	1,194	1,154	1,046
		\pm SD	0,031	0,008	0,005	0,012	0,060	0,020	0,027	0,019	0,061	0,019	0,016
Colorante azul	5,5µM	\bar{X} 1,000	1,000	0,999	1,004	1,016	0,995	0,995	0,994	1,009	0,996	0,996	0,994
		\pm SD	0,000	0,008	0,011	0,010	0,006	0,006	0,005	0,016	0,007	0,005	0,005
	0 µM	\bar{X} 1,005	1,005	0,999	1,003	0,998	0,995	1,000	1,028	1,000	1,000	0,999	1,011
		\pm SD	0,007	0,007	0,010	0,010	0,005	0,005	0,067	0,005	0,009	0,008	0,039

Los resultados mostrados en la Tabla corresponden a la media y \pm SD de las máximas obtenidas en dos ensayos independientes. Los valores en gris son de un solo ensayo.

En la Tabla 5, se observan que el Kit Azul no da ventana para nuestro ensayo. En relación a la densidad celular, se decidió utilizar 15.000 células como se recomienda en el manual del kit de marcaje utilizado, dado

que los resultados obtenidos no muestran una densidad claramente mejor frente al resto. En relación al tiempo de marcaje, se observa una mayor ventana a los 45 minutos.

Como puede observarse en la Figura 9, a mayor concentración de veratridine, mayor es la ventana de ensayo. La concentración de 50µM de veratridine final por pocillo es la más óptima de las concentraciones ensayadas. La determinación de la EC₅₀ de la veratridine así como la verificación de la concentración elegida se detalla más adelante (ver apartado 5.1.1.4.)

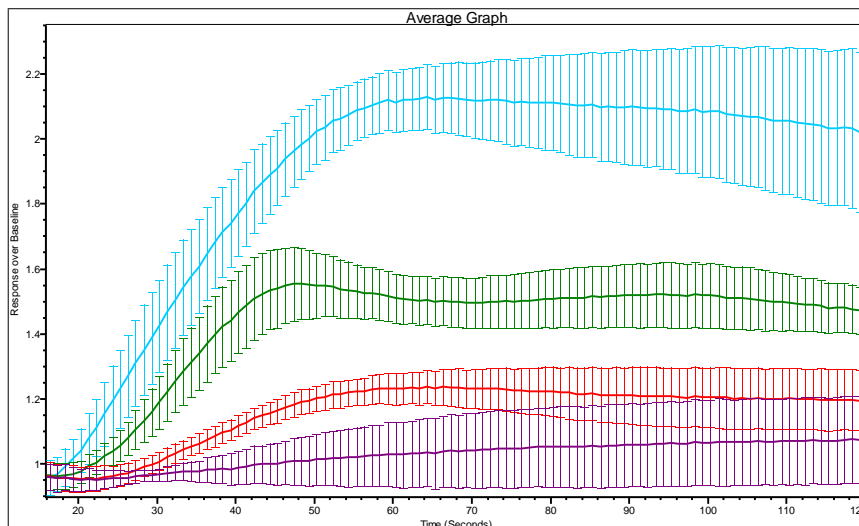


Figura 9. Cinética de las distintas concentraciones de la veratridine en células HEK 293 con el canal Nav_{1.x} sobreexpresado.

Gráfica de las medianas entre las 16 réplicas de con sus respectivas desviaciones estándar. Los tratamientos fueron 50 µM, 16,5 µM, 5,6 µM de veratridine y el vehículo representados respectivamente con los colores azul cielo, verde, rojo y morado. Se sembraron 15.000 células con medio completo por pocillo y antes de añadir el colorante se lavó la placa. Análisis realizado con el programa *ScreenWorks*.

A continuación se procedió a la repetición de la matriz sin realizar el lavado previo usando solo el kit rojo dado a los resultados obtenidos con el azul. Además se comprobó si la concentración final del FBS interfería en la ventana de ensayo. Con el fin de que la reducción de suero no afectase al crecimiento celular, se usó un medio específico (OPTIMEM) que permite crecer las células en medio con bajo contenido en FBS.

Tabla 6. Resultados generados con la matriz de los distintos parámetros ensayados sin lavar las placas con el Aquamax 4000.

		10.000 células					12.500 células					15.000 células					20.000 células				
		15 min	30 min	45 min	60 min	75 min	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min
0,5% FBS	\bar{x}	1.995	1.799	2.021	1.943	1.873	1.939	1.984	2.008	2.031	1.995	1.976	1.969	2.078	2.058	1.946	1.974	1.940	1.960	1.868	1.855
	\pm SD	0.090	0.119	0.035	0.052	0.068	0.070	0.129	0.034	0.069	0.053	0.142	0.056	0.047	0.017	0.077	0.030	0.076	0.041	0.053	0.026
5% FBS	\bar{x}	1.571	1.735	1.731	1.753	1.770	1.784	1.765	1.674	1.890	1.681	1.736	1.739	1.731	1.690	1.668	1.686	1.750	1.850	1.773	1.678
	\pm SD	0.170	0.132	0.123	0.074	0.124	0.142	0.162	0.082	0.115	0.096	0.064	0.175	0.129	0.089	0.055	0.129	0.042	0.134	0.090	0.133

Los resultados mostrados en la Tabla corresponden a la media de los máximos y \pm SD de dos ensayos independientes. Estos ensayos se realizaron en Optimem y no se lavó.

Tal y como se observa en la Tabla 6, las condiciones finales son las mismas que lavando la placa. Con el fin de corroborar estos resultados se procedió a ensayar en paralelo lavando y sin lavar a las condiciones seleccionadas Tabla 7.

Tabla 7. Resultados de los ensayos lavando y sin lavar a distintas concentraciones de FBS final.

		HEK 293 Nav 1,x		
		NO LAVADO		LAVADO
		5% FBS	0,5% FBS	0% FBS
Veratridine	\bar{X}	2,141	2,225	2,174
	\pm SD	0,067	0,044	0,127
Vehículo	\bar{X}	0,994	0,995	1,096
	\pm SD	0,009	0,009	0,117

Mediana de los puntos máximos obtenidos entre 10 y 120 segundos de las distintas réplicas de ensayo

Como se puede observar en la Tabla 7, no se muestran diferencias significativas en la ventana de ensayo entre las células que han sido lavadas con el AquaMax 4000 y las que no, tanto si han sido sembradas al 10% y al 1% de FBS.

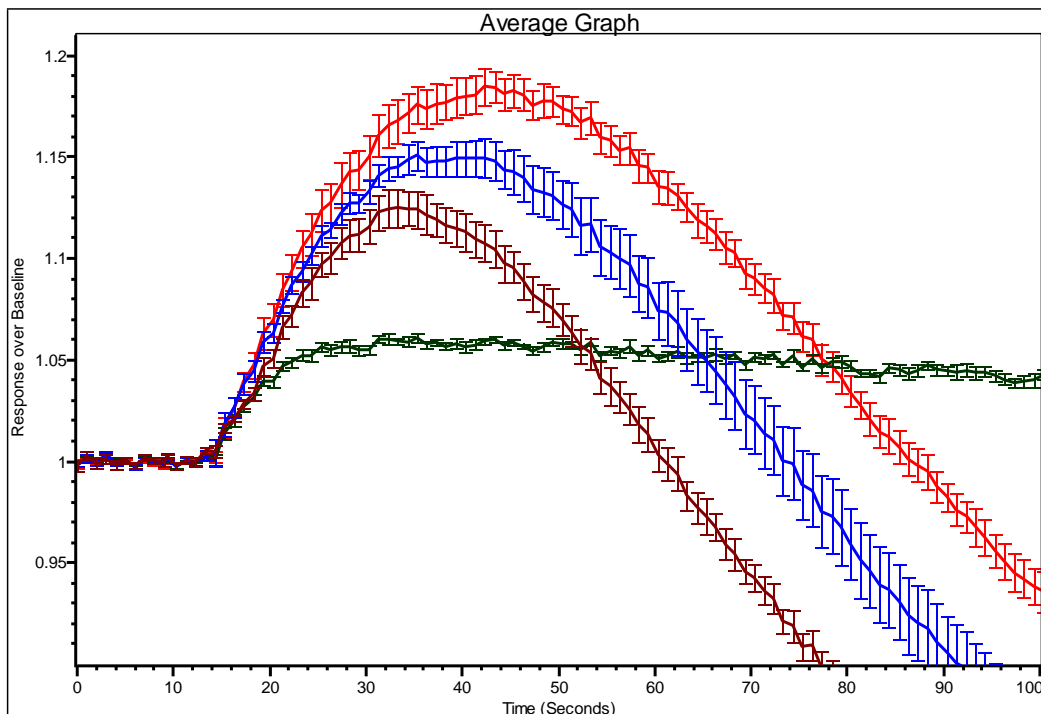


Figura 10. Cinéticas de los ensayos realizados con células en suspensión.

La gráfica muestra las medianas de las cinéticas obtenidas entre las 8 réplicas con sus respectivas desviaciones estándar, sembradas a distintas densidades celulares 60.000 (rojo), 40.000 (azul marino) y 20.000(marron) células por pocillo, tratadas con 50 μ M de veratridine. La cinética de color verde oscuro corresponde al vehículo. Análisis realizado con el programa *ScreenWorks*.

En conclusión, se decidió no utilizar el AquaMax 4000 con el fin de prescindir de un robot y ahorrar costes, ya que el volumen de buffer necesario entre el ensayo con lavador o sin él es de 1,5 L. Por otro lado, el hecho de poder mantener el suero en el ensayo, permitirá en ensayos posteriores caracterizar y evaluar el efecto de los inhibidores en presencia de FBS.

4.1.1.2. Ensayo en suspensión

Se continuó la puesta a punto ensayando, paralelamente, con células en suspensión y con células adheridas a distintas densidades.

Viendo los resultados obtenidos en la Figura 10, se descartó la posibilidad de realizar el ensayo en suspensión ya que la ventana fue inferior a 1.2x. Creemos que esto podría estar causado por la pérdida de eficiencia del Kit de marcaje en esta condición o que este formato de ensayo entorpeciera la acción de la veratridine. Probablemente, una causa de este mal resultado, podría deberse a las velocidades y alturas de dispensación, de los compuestos y estímulos, por parte del FLIPR® Tetra a la placa de células.

4.1.1.3. Especificidad de la señal

Con la finalidad de ver si la respuesta que estábamos obteniendo era específica de nuestro canal, se realizaron ensayos paralelos con dos líneas celulares: las HEK 293 con el canal Nav1.x y las HEK 293 parentales. Además se testaron los inhibidores P y E, que es específico para nuestro canal.

Al comparar los resultados entre las dos líneas celulares, ver Figura 11, se confirmó que la señal que estábamos obteniendo era específica de nuestro canal, ya que en la línea de las células parentales no se observó respuesta al estímulo con veratridine a 50 μ M.

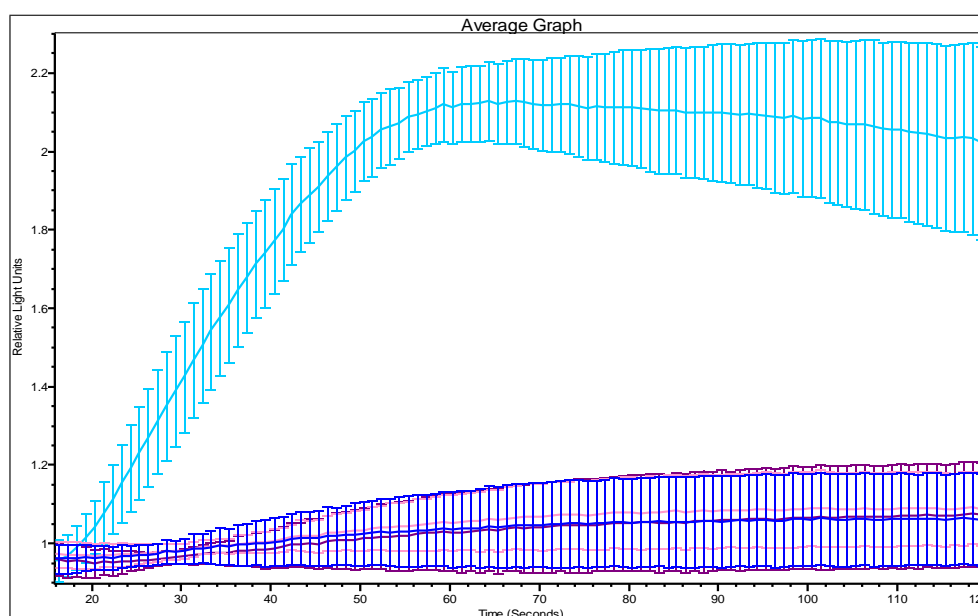


Figura 11. Especificidad de la respuesta, células parentales.

La gráfica muestra las medianas de las cinéticas obtenidas entre 16 réplicas con sus respectivas desviaciones estándar, sembrando a una densidad de 15.000 células en medio competo, lavando la placa antes de añadir el colorante rojo y tratado con 50 μ M de veratridine. Células HEK 293 con el canal Nav_{1.x} sobreexpresado Tratadas con veratridine (azul cielo), vehículo de las células HEK 293 con el canal Nav_{1.x} sobreexpresado (morada), Células HEK 293 parentales Tratadas con veratridine (rosa), vehículo de las células HEK 293 parentales (azul marino), Análisis realizado con el programa *ScreenWorks*.

Además, los compuestos P y E inhibieron la activación del canal, ver en Figura 12, confirmando nuevamente la especificidad de nuestra línea celular.

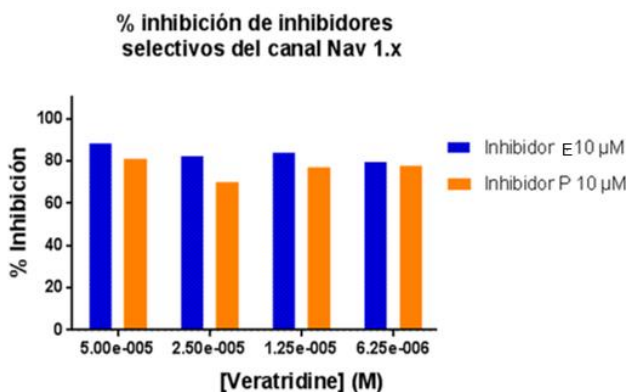


Figura 12. Especificidad de la respuesta, inhibidores selectivos del canal Nav 1.x.

Gráfica de porcentaje de inhibición de los inhibidores específicos para Nav 1.x P y E. Análisis realizado con el *Graphpad Prism 6*.

4.1.1.4. Concentración de veratridine y el efecto del DMSO

Una parte importante de la puesta a punto del ensayo fue determinar la potencia de la veratridine, confirmar la dosis elegida en ensayos anteriores y ver como como afecta el vehículo a la dosis elegida. Con el fin de resolver los tres puntos mencionados anteriormente, se diseñó un ensayo de dosis-respuesta ver Figura 13.

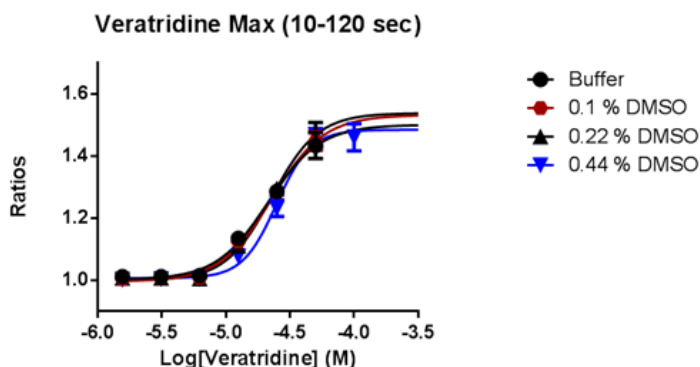


Figura 13. Representación gráfica de la EC₅₀ de la veratridine con distintos porcentajes finales de DMSO.

Ensayo representativo de las distintas réplicas independientes realizadas. Análisis realizado con el *Graphpad Prism 6*.

Al observar la Tabla 8 vemos que prácticamente no hay diferencia en la ventana de ensayo en ninguna de las condiciones mostradas. Finalmente se decidió ensayar con 50 µM de veratridine y 0,22% de DMSO final, ya que obteníamos una buena ventana de ensayo y la concentración inicial de DMSO era suficiente para disolver los compuestos.

Tabla 8. DMSO final y EC₅₀ de la vertridine.

Agrupación de los resultados obtenidos en la réplica 2 representativos de los distintos ensayos. La fila de la veratridine corresponde a los puntos máximos obtenidos entre los 10 y 120 segundos de ensayo. Cálculos de las EC₅₀ realizados con el *Graphpad4*.

	Buffer	DMSO		
		0.10%	0.22%	0.44%
Ventana	1.95	1.966	1.969	1.942
EC ₅₀	1.981E-05	2.025E-05	2.068E-05	2.485E-05

Comparación de los resultados del FLIPR® Tetra y el PatchClamp

Una vez finalizada la puesta a punto del ensayo de FLIPR® Tetra para los VGSCs, se caracterizaron los inhibidores a 0,5% y 5% de FBS final. Finalmente los resultados obtenidos en el FLIPR® Tetra se contrastaron con los valores de *PatchClamp* de la base de datos interna de Almirall para evaluar la factibilidad de uso del ensayo de FLIPR® Tetra como nuevo ensayo primario.

4.2.1. Potencia de los inhibidores

Todos los compuestos ensayados inhibieron la activación del canal de un modo dosis dependiente. En la Tabla 9 se muestran los resultados obtenidos con el ensayo puesto a punto, así como los resultados de electrofisiología de la base interna de Almirall, excepto para el compuesto P. Este compuesto, mostró un comportamiento cinético diferente a todos los demás y es tratado en un apartado aparte.

4.2.1.1. Comparación del ensayo de FLIPR con la electrofisiología (0,5% final de FBS)

Tabla 9. Resultados de FLIPR® y valores de *IonWorks Quatro*, *PatchXpress* y *Ionworks Barracuda* (base de datos Almirall)

		Electrofisiología			FLIPR 0.5% FBS		FLIPR 5% FBS	
		IonWorks	PatchXpress	IWB	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD
COMPUESTOS	F	3,40E-06	3,20E-05	1,70E-05	4,30E-06	1,4E-06	3,73E-06	2,2E-06
	G	1,00E-06	1,50E-06	1,50E-05	3,04E-08	1,3E-08	5,00E-08	3,6E-08
	D	6,00E-07	2,60E-06	3,10E-06	2,51E-06	2,9E-06	1,36E-06	1,5E-06
	C	1,00E-06	2,40E-06	1,50E-06	6,00E-07	3,2E-07	1,17E-06	4,7E-07
	E	3,90E-07	1,50E-06	3,30E-06	1,98E-07	7,9E-08	2,37E-07	1,3E-07
	A	8,50E-07	4,40E-07	7,7E-08	5,82E-06	5,3E-06	5,77E-06	2,1E-06
	B	2,60E-07	4,20E-06	2,00E-06	1,05E-07	4,1E-08	1,51E-07	7,3E-08
	I	1,80E-06	6,50E-07	1,10E-06	1,27E-07	7,6E-08	6,18E-08	3,7E-08
	J	1,10E-05	1,80E-05		4,64E-06	3,5E-06	3,07E-06	1,4E-06
	K	2,80E-07	4,70E-06	4,00E-07	3,00E-07	1,4E-07	2,90E-07	1,4E-07
	M	6,00E-06	2,40E-07	1,30E-07	1,91E-08	9,1E-09	5,57E-09	6,6E-09
	L	2,20E-06	3,80E-06	2,10E-05	3,40E-07	2,3E-07	2,80E-07	1,8E-07
	N	4,10E-07	7,00E-06	1,30E-06	8,50E-07	7,4E-07	1,04E-06	6,6E-07
	O	2,80E-08	1,20E-06	1,60E-08	8,20E-08	1,6E-08	6,15E-08	3,2E-08
	H	1,20E-08	4,60E-07	3,70E-08	1,40E-08	7,1E-09	4,35E-08	2,2E-08
	Q	1,50E-05			4,50E-06	2,1E-06		
	R	6,50E-07			3,90E-07	1,4E-08		
	S	1,90E-07	4,60E-06		8,60E-08	1,8E-08		
	T	3,30E-06			1,01E-06	2,8E-07		
	U	7,60E-07			5,80E-06	8,5E-07		
	V	5,20E-07	1,90E-06		8,15E-07	7,8E-08		
	W	3,70E-07	3,30E-06		8,75E-07	6,4E-08		
	X	8,10E-07	1,50E-07		8,50E-07	2,1E-07		
	Y	2,00E-07	9,70E-07		1,25E-07	7,1E-09		

Los resultados mostrados en la tabla corresponden a la media±SD de varios ensayos independientes (entre 5 y 12). Las casillas vacías corresponden a ensayos no realizados.

De los resultados de la Tabla derivan las siguientes observaciones. En primer lugar, 18 de los 24 compuestos ensayados FLIPR® Tetra (sin tener en cuenta el inhibidor P) muestran una potencia del mismo orden a la obtenida con los ensayos de electrofisiología realizados por Almirall anteriormente con la plataforma

IonWorks quatro (Ensayo usado como primer cribado de moléculas). Entendemos que los valores están en el mismo orden de potencia cuando no se triplica su valor.

Los 6 compuestos que no muestran un mismo orden de potencia entre los dos tipos de ensayo son: A, D, G, I, L y M. Estas diferencias de potencia van de 4,2 veces, en el caso del compuesto D, hasta 315 veces de diferencia en caso del inhibidor M. Con el fin de confirmar cuál de los ensayos era más relevante como ensayo primario, se procedió a la comparación de los resultados, con los obtenidos usando dos protocolos adicionales de electrofisiología con dos plataformas distintas, *PatchXpress* y *IonWorks Barracuda*. Ambos protocolos favorecen la formación del estado inactivo de los VGSCs, aumentando el tiempo de exposición de los compuestos al canal en el mencionado estado. Además, el protocolo de *IonWorks Barracuda* imita condiciones patofisiológicas de dolor neuropático. A continuación se detallan las observaciones resultado de la comparación:

Compuesto D: A pesar de que la diferencia de potencia obtenida con FLIPR® Tetra es 4,2 veces inferior a la obtenida con *IonWorks quatro* se puede considerar válido el ensayo de FLIPR® Tetra. Esto se debe a que los resultados obtenidos con los dos protocolos adicionales de Electrofisiología (*IonWorks Barracuda* y *Patch Xpress*) son de orden micromolar.

Compuesto G: Este compuesto muestra una potencia muy superior en los ensayos de FLIPR® Tetra frente a todos los de electrofisiología. Su baja solubilidad y alta lipofobicidad pueden ser la explicación de las diferencias.

Compuesto I: Los resultados obtenidos con FLIPR® Tetra muestran que el compuesto es 14 veces más potente que con el *IonWorks quatro*. Al realizar los ensayos con *Patch Xpress* el resultado sigue mostrando una superioridad de potencia con una reducción de la diferencia de 9 veces, siendo de 5 veces mayor en FLIPR® Tetra. Se considera que la hipótesis que explica la gran reducción de potencia obtenida es: a mayor tiempo de exposición del inhibidor con el canal de sodio se reduce la diferencia de potencia entre ambos ensayos. Es decir el compuesto sería más potente si consiguiéramos una mayor exposición en los ensayos de electrofisiología.

Compuesto L y A: No tenemos una explicación de la diferencia de potencia entre 6 y 7 veces. A pesar de ello, el hecho que la diferencia no supere las 7 veces, indica que es una buena aproximación de la potencia del compuesto. Sería interesante seguir ensayando estos compuestos tratándolos de un modo distinto como por ejemplo añadir detergente para mejorar su solubilización.

Compuesto M: Los resultados de este compuesto son fascinantes ya que obtenemos una potencia 315 veces mayor en FLIPR® Tetra que en *IonWorks quatro*. Al realizar los dos protocolos adicionales de electrofisiología (*IonWorks Barracuda* y *Patch Xpress*) se obtiene una potencia del mismo orden al obtenido con FLIPR® Tetra, confirmando la validez del ensayo.

4.2.1.2. Efecto del suero en la potencia de los compuestos

Los resultados de la Tabla referentes a los ensayos con 5% de FBS se encuentran en el mismo orden de magnitud (diferencias no superiores a 3,4 veces) que los obtenidos en los ensayos realizados al 0,5% de FBS comentados en el apartado anterior.

Al compararlos con los distintos resultados de electrofisiología se observa que los compuestos a destacar por su diferencia de potencia entre los distintos ensayos realizados son los mismos que en el caso anterior.

4.2.2. Inhibidor P

Como se ha comentado anteriormente este compuesto no se ha incluido en la Tabla 9 de resultados debido a la naturaleza del mismo. Este inhibidor muestra una cinética distinta a los otros (Figura 14, A) seguramente debida a su especificidad por el estado *slow inactivated* descrito en la bibliografía. A lo largo del proyecto este compuesto ha resultado ser útil como control del estado de las células.

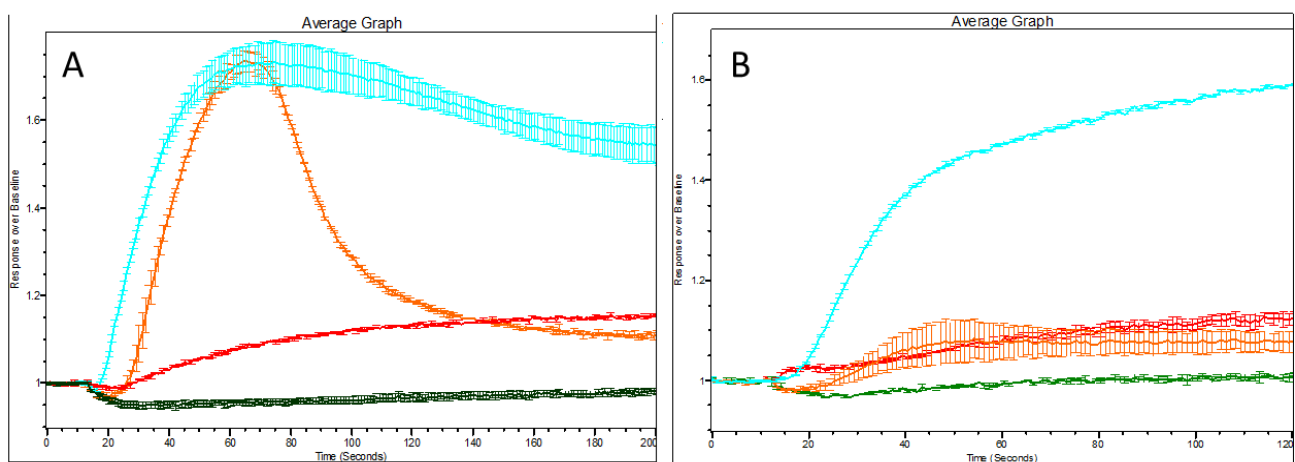


Figura 14. Cinética del inhibidor P.

La cinética del inhibidor P (color naranja) es distinta al resto de compuestos y se observa su efecto aproximadamente a los 2 minutos de su adicción, al contrario que el resto que surgen efecto desde el principio como el inhibidor M (color rojo). La cinética azul corresponde al Top y la cinética verde al Basal. Gráfica de las medianas entre 2 réplicas con sus respectivas desviaciones estándar. Células expuestas a una concentración de 25 μ M de compuesto. Análisis realizado con el programa *ScreenWorks*.

En los ensayos de FLIPR[®] Tetra no podemos controlar el voltaje al que se somete a las células. En condiciones basales, las células tienen potenciales de membrana de -70 mV. Debido a que este potencial no es controlable, al contrario que en la electrofisiología, las células pueden adoptar distintos potenciales según su estado debido a factores como el pase celular, confluencia etc. A lo largo de los ensayos, pudimos observar que había casos en los que el inhibidor perdía su cinética (Figura 14, B) inhibiendo en los primeros segundos y no a los minutos. Este efecto lo atribuimos a que posiblemente las células estaban más despolarizadas de lo normal. Ante esta observación, se decidió incluir este inhibidor como control del estado de las células, descartando aquellos ensayos en los que se observaba el perfil de la Figura B. La IC₅₀ del inhibidor P resultó ser de $x=0.7 \times 10^{-9} \pm SD=4.4 \times 10^{-10}$ (n=4), que correlaciona bien con los resultados obtenidos en electrofisiología: *IonWorks Barracuda* 2×10^{-9} , *IonWorks quatro* 7×10^{-9} , *Patch Xpress* 5.0×10^{-9} .

5. CONCLUSIONES:

- The set-up of the membrane potential for the channel Nav1.x using the molecular devices kit has been carried out successfully.
- The 24 inhibitors for the sodium channels Nav1.x are characterized using the fluorescence assay carried out with the FLIPR Tetra.
- The obtained power with the FLIPR assay was of the same order of magnitude than the results that were obtained by using electrophysiology for more than the 87,5% of the tested compounds, as much as in the presence or lack of FBS.
- From the 12,5% of the inhibitors that didn't match, its 66% provided a higher power in FLIPR Tetra, for that reason they would be detected letting its subsequent characterization in patchclamp assays. Regarding the remaining 33% a lower power is obtained in FLIPR. This should be due to a bad solubilization, and this divergence, at its time, is dependent from the compound and not from the assay.
- The fluorescence assay with the FLIPR Tetra could be consider acceptable as a primary assay of characterization and narrowed down for particular inhibitors of the channel sodium Nav1.x, which lets a major throughput and a reduce of the assay, by doing this, we are putting the electrophysiology as a confirmation activity and inhibitors characterization assay.

6. BIBLIOGRAFIA:

- Brackenbury, W. J. and L. L. Isom (2011). "Na⁺ channel β subunits: overachievers of the ion channel family." *Frontiers in pharmacology* **2**.
- Catterall, W. A. (2000). "From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels." *Neuron* **26**(1): 13-25.
- Charand, K. X. from <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbasees/biology/actpot.html>.
- Chen, C., J. D. Calhoun, Y. Zhang, L. Lopez-Santiago, N. Zhou, T. H. Davis, J. L. Salzer and L. L. Isom (2012). "Identification of the cysteine residue responsible for disulfide linkage of Na⁺ channel α and β 2 subunits." *Journal of Biological Chemistry* **287**(46): 39061-39069.
- Denac, H., M. Mevissen and G. Scholtysik (2000). "Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels." *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **362**(6): 453-479.
- Dib-Hajj, S. D., Y. Yang, J. A. Black and S. G. Waxman (2013). "The Nav1.7 sodium channel: from molecule to man." *Nature Reviews Neuroscience* **14**(1): 49-62.
- Felix, J. P., B. S. Williams, B. T. Priest, R. M. Brochu, I. E. Dick, V. A. Warren, L. Yan, R. S. Slaughter, G. J. Kaczorowski and M. M. Smith (2004). "Functional assay of voltage-gated sodium channels using membrane potential-sensitive dyes." *Assay and drug development technologies* **2**(3): 260-268.
- FLUOFARMA (2013). from www.fluofarma.com/flipr-screening-services-cro.html.
- Frank, H. Y. and W. A. Catterall (2003). "Overview of the voltage-gated sodium channel family." *Genome Biol* **4**(207): 10.1186.
- Goldin, A. L. (2003). "Mechanisms of sodium channel inactivation." *Current opinion in neurobiology* **13**(3): 284-290.
- Halford, B. (2014). "Changing The Channel." *Chemical & Engineering News* **92**(12): 10-14.
- Jukic, M., D. Kikelj and M. Anderluh (2014). "Isoform selective voltage-gated sodium channel modulators and the therapy of pain." *Current medicinal chemistry* **21**(2): 164-186.
- Kaczorowski, G. J., O. B. McManus, B. T. Priest and M. L. Garcia (2008). "Ion channels as drug targets: the next GPCRs." *The Journal of general physiology* **131**(5): 399-405.
- Karoly, R., N. Lenkey, A. O. Juhasz, E. S. Vizi and A. Mike (2010). "Fast-or slowinactivated state preference of Na channel inhibitors: a simulation and experimental study." *PLoS Comput Biol* **6**: e1000818.
- Kelemen, A. and P. Halász (2010). "Lacosamide for the prevention of partial onset seizures in epileptic adults." *Neuropsychiatric disease and treatment* **6**: 465.
- Kim, J.-B. (2014). "Channelopathies." *Korean journal of pediatrics* **57**(1): 1-18.
- King, G. F. and I. Vetter (2014). "No gain, no pain: Nav1.7 as an analgesic target." *ACS chemical neuroscience* **5**(9): 749-751.
- Klint, J. K., J. J. Smith, I. Vetter, D. B. Rupasinghe, S. Y. Er, S. Senff, V. Herzig, M. Mobli, R. J. Lewis and F. Bosmans (2015). "Seven novel modulators of the analgesic target Nav1.7 uncovered using a high-throughput venom-based discovery approach." *British journal of pharmacology* **172**(10): 2445-2458.
- Trivedi, S., K. Dekermendjian, R. Julien, J. Huang, P.-E. Lund, J. Krupp, R. Kronqvist, O. Larsson and R. Bostwick (2008). "Cellular HTS assays for pharmacological characterization of Nav1.7 modulators." *Assay and drug development technologies* **6**(2): 167-179.
- Zheng, W. and L. Kiss (2003). "Screening technologies for ion channel targets in drug discovery." *Am Pharm Rev* **6**: 85-92.
- Zheng, W., R. H. Spencer and L. Kiss (2004). "High throughput assay technologies for ion channel drug discovery." *Assay and drug development technologies* **2**(5): 543-552.