

PÉPTIDOS SINTÉTICOS ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR NMDA CON EFECTO DE NEUROPROTECCIÓN EN MODELO DE ISQUEMIA *in-vitro*.

Campo de la Invención.

La presente invención pertenece al campo de péptidos moduladores de la actividad del receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDAR), con efecto de neuroprotección sobre neuronas hipocampales de cultivo primario sometidas al modelo de isquemia *in-vitro*. Específicamente hace referencia a dos péptidos sintéticos antagonistas del flujo iónico a través del NMDAR, con especificidad hacia las subunidades GluN2B y GluN2A, siendo más selectivos por la subunidad GluN2B. El efecto antagónico determinado para los dos péptidos, medido por la IC_{50} y estudios en el modelo de Deprivación de Oxígeno-Glucosa (OGD), permiten establecer el efecto de neuroprotección ante eventos de excitotoxicidad mediados por el ión Calcio (Ca^{2+}).

Estado del Arte de la invención.

El receptor activado por N-metil-D-aspartato (NMDAR) es el encargado de permitir el flujo de iones calcio (Ca^{2+}) al interior de la neurona postsináptica, también permite el paso de iones sodio (Na^{+}) al interior de la célula, motivo por el cual participa en el proceso de plasticidad sináptica, es decir en la potenciación a largo plazo (LTP) o en la depresión a largo plazo (LTD). Éstos procesos (LTP y LTD) están directamente relacionados con procesos cognitivos en el sistema nervioso central, como lo son los procesos de consolidación y maduración de los circuitos neuronales permitiendo así la formación de redes neuronales funcionales y también los procesos cognitivos centrales de la memoria y aprendizaje (1) (2).

El NMDAR es un complejo proteínico transmembranal, formado por cuatro subunidades proteicas. Su ligando fisiológico es el Glutamato (Glu), el cual es su agonista principal; además, tiene como co-agonista al aminoácido Glicina (Gly). Presenta una dependencia de voltaje para retirar el bloqueador fisiológico del canal que es el ión magnesio (Mg^{2+}). La apertura del canal es posible cuando el NMDAR tiene al Glu y Gly en los respectivos sitios de unión, y al mismo tiempo ocurre el cambio en el potencial de la membrana (éste cambio es debido a la activación de los receptores AMPA) el cual retira el bloqueo por

Mg²⁺ (3). Cuando el canal se encuentra abierto presenta alta permeabilidad a los iones Ca²⁺ y Na⁺, permitiendo la salida de iones K⁺. Una de las características más relevantes de los NMDAR es su alta velocidad de disparo o de apertura del canal y lento decaimiento. El NMDAR es regulado por la acción de otras moléculas que pueden actuar como moduladores alostéricos. Gracias a esta estricta regulación del canal, el NMDAR puede generar corrientes excitatorias postsinápticas duraderas (4).

La topología general del receptor está caracterizada por tener cuatro grandes regiones: la primera es el dominio N-terminal (ATD), la segunda es el dominio de unión al ligando (LBD), la tercera es el dominio o región transmembranal (TMD) y el dominio C-terminal (CTD). La región ATD es un dominio N-terminal extracelular al cual se puede unir reguladores alostéricos positivos (que favorecen la apertura del canal) o negativos (promueven el bloqueo del canal) los cuales son pequeñas moléculas como algunas poliaminas, Zinc e ifenprodil (antagonista). La segunda región LBD, también es una región extracelular de cada subunidad, se compone de un tándem de dominios (S1/S2) que conforman una región bisagra, en donde la subunidad GluN2B se une a Glu, mientras que la subunidad GluN1 se une al co-agonista Glicina (Gly) o D-serina (D-Ser) (5).

La región de membrana TMD contiene tres segmentos transmembranales (TM1, TM3 y TM4), un dominio bucle reentrante (TM2) que conforma el poro, el cual presenta sitios de unión para bloqueadores como Mg²⁺, MK801, memantina o ketamina, que actúan como antagonistas no competitivos. El dominio CTD es el extremo C-terminal citoplasmático, que varía de tamaño dependiendo las subunidades, y proporciona varios sitios de interacción con numerosas proteínas intracelulares (6).

Una de las características farmacológicas más relevantes de los NMDARs es la alta selectividad de sus antagonistas, motivo por el cual se han tomado como blancos para el diseño de fármacos en los tratamientos de las enfermedades neurodegenerativas. Desde la década de los 80's se inician tratamientos a pacientes con Ketamina y ácido 2-amino-5-fosfonovaleriánico APV (7). Al inicio de los 90's se analizan otros antagonistas en varios modelos animales, entre estos está el Dizolcilpine más conocido como MK-801 y el dextrophan (8). Otros antagonistas de NMDAR estudiados en el daño del nervio ciático son: la amantadina y la memantina (9).

En los últimos 20 años una de las estrategias abordadas fue el diseño de péptidos, que funcionaran como antagonistas selectivos de los NMDARs. Dentro de las subunidades más estudiadas esta GluN2B, en la cual se han probado péptidos diseñados desde la secuencia de la Conantoquina, la cual es una neurotóxina proveniente del caracol marino del género *Conus* (*Conus tulipa*, *Conus parius* y *Conus geographus*, entre otros) que contienen entre 17 a 27 aminoácidos, teniendo alto porcentaje en su secuencia del aminoácido modificado ácido γ -carboxiglutamato (Gla), careciendo de enlaces disulfuro (1)(10)(11).

Se ha identificado que el péptido de la conantoquina-G (Con-G) purificado de la toxina puede atravesar la barrera hematoencefálica y tiene selectividad de unión por la subunidad GluN2B actuando como antagonista no competitivo, estableciendo que su efecto antagonista es 20 veces más potente en los receptores con la conformación GluN1:GluN2A y GluN1:GluN2B con respecto a las otras conformaciones del NMDAR (10). La conantoquina-Br (Con-Br) tiene mayor efecto antagónico para las conformaciones GluN1:GluN2D del NMDAR (12)(13)(14). La conantoquina-R (Con-R) y la conantoquina-T (Con-T) tienen efecto antagónico sin presentar especificidad por ninguna de las subunidades de GluN2. La Con-R y la Con-G han llegado a la fase de estudios preclínicos demostrando efectos positivos en tratamientos de dolor crónico, accidente cerebrovascular y convulsiones (10)(15)(16).

De acuerdo con lo anterior el papel de las diferentes conantoquinas, en especial, el de la Con-G como antagonista de la corriente evocada por el NMDAR ha sido estudiada en diversos campos, lo cual ha permitido la solicitud de numerosas patentes con relación al uso de la Con-G sobre el NMDAR. En una primera aproximación se han encontrado 144 patentes concedidas y 370 patentes postuladas a la fecha de febrero de 2020, relacionadas con la Con-G, en la tabla 1 se hace una síntesis al respecto donde se observan las diferencias en las IC50 empleadas en los diferentes modelos (Tabla 1). Por ejemplo, La patente US6277825B1 presenta péptidos de conantoquinas que tienen de 10 a 30 aminoácidos, que incluyen preferiblemente dos o más residuos de ácido γ -carboxiglutamato, para el tratamiento de trastornos neurológicos y trastornos psiquiátricos. Se presenta evidencia del efecto que tienen los péptidos en modelos *in-vitro* e *in-vivo* de epilepsia, dolor y Parkinson (17). La patente ES2207970T3 presenta la modificación sobre el péptido diseñado a partir de la secuencia de la Con-G, en donde, se

establece una estructura cíclica que ha demostrado tener efectos antagónicos sobre el NMDAR, gran estabilidad química y mejor biodisponibilidad (18). La patente US 6399574B1 presenta diferentes quimeras realizadas sobre diferentes conantoquinas, en donde se obtienen diversos péptidos los cuales son probados sobre cultivo primario de neuronas, e inducen en diversos modelos desórdenes patológicos como Alzheimer, esclerosis lateral múltiple, esquizofrenia, y alteraciones como la ansiedad (19).

La patente US9782454B2 presenta estructuras de análogos de polipéptidos naturales, la administración de las composiciones puede usarse para efectuar tratamiento o prevención de una pluralidad de enfermedades causadas por vías bioquímicas o biológicas disfuncionales. Las composiciones y métodos de esta invención son particularmente útiles para identificar nuevos módulos terapéuticos indicadores de actividad (20). La patente CO15303915 / WO 2017/109756 A2, presenta una serie de péptidos moduladores de la actividad del receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA). Específicamente hace referencia a dos péptidos sintéticos antagonistas del influjo iónico a través del receptor NMDA con especificidad hacia las subunidades GluN2B y GluN2A del receptor NMDA y a un péptido con actividad agonista sobre el receptor NMDA en cultivos de neuronas hipocámpales de rata (21).

Por la complejidad del NMDAR en su funcionamiento y regulación, así como la efectividad demostrada por las conantoquinas al modular la intensidad de la corriente evocada por el NMDAR, estas sustancias presentan un gran número de opciones farmacológicas que permitirían postularlas como sustancias moduladoras del NMDAR, el cual media los procesos centrales de memoria y aprendizaje. Se ha comprobado que la desregulación del canal participa en numerosas enfermedades de tipo neurodegenerativo y neuropsicóticas. La búsqueda de moduladores que puedan ser postulados desde estudios *in-vitro* hasta estudios clínicos como posibles fármacos mantiene abierto este campo de estudio.

Descripción de las figuras

Figura 1: Espectrometría de masas (MS) de péptidos puros (G) Peso Molecular (PM) teórico de secuencias A. SEQ ID NO: 4 de 1931 u.m.a, señal m/z reportada: 1932.123

u.m.a (Da). (H) PM teórico B. SEQ ID NO: 5 de 1992.1 u.m.a (Da), señal m/z reportada 1992,201 u.m.a (Da).

Figura 2: Porcentaje (%) de inhibición de la corriente de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 sobre la línea celular tsA201 – HEK293 con expresión del NMDAR. De color rosado se presentan los controles (-) con Glu 1000 μ M / Gly 100 μ M, de amarillo SEQ ID NO: 4 (diferentes concentraciones) y de verde SEQ ID NO: 5 (diferentes concentraciones). En todos los puntos de concentración n=9. Determinación de la significación estadística de los resultados obtenidos en las pruebas electrofisiológicas de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.

Figura 3: Registro electrofisiológicos en Whole-Cell del péptido SEQ ID NO: 4. A SEQ ID NO: 4 a 1000 μ M. B SEQ ID NO: 4 a 500 μ M. C. SEQ ID NO: 4 a 50 μ M. D. SEQ ID NO: 4 a 10 μ M. E SEQ ID NO: 4 a 1 μ M y F. SEQ ID NO: 4 a 0.1 μ M.

Figura 4: Registro electrofisiológicos en Whole-Cell del péptido SEQ ID NO: 5. A SEQ ID NO: 5 a 1000 μ M. B SEQ ID NO: 5 a 500 μ M. C. SEQ ID NO: 5 a 50 μ M. D. SEQ ID NO: 5 a 10 μ M. E SEQ ID NO: 5 a 1 μ M y F. SEQ ID NO: 5 a 0.1 μ M.

Figura 5: Curva Dosis-respuesta para IC₅₀ de los péptidos SEQ ID NO: 4 (Círculo negro) y SEQ ID NO: 5 (Círculo blanco).

Figura 6 Registro de la corriente de EPSC de neuronas hipocampales. A y B. se presenta la actividad basal y la aplicación del péptido SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO:5, ambos en una concentración 150 μ M. los recuadros rojos presentan las regiones ampliadas. C. se presenta la actividad basal y la aplicación del vehículo, no se observa cambio en la actividad. D. Amplitud de la corriente de EPSC comparando los estados basales con respecto a la aplicación del péptido SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.

Figura 7 Determinación control de Ca²⁺ intracelular de neuronas hipocampales de cultivo primario. A. Registro obtenido de 10 neuronas por la lectura de las imágenes de Ca²⁺ sin OGD. B. Análisis estadístico de neuronas sin OGD se presentan los porcentajes de respuesta a cada estímulo. C. presenta la relación de la fluorescencia máxima obtenida por cada estímulo y se compara con respecto al ingreso de iones por el NMDAR. D.

Registro obtenido de 10 neuronas por la lectura de las imágenes de Ca^{2+} con realización de OGD. E. Análisis estadístico de neuronas con OGD se presentan los porcentajes de respuesta a cada estímulo. F. presenta la relación de la fluorescencia máxima obtenida por cada estímulo y se compara con respecto al ingreso de iones por el NMDAR.

Figura 8 Determinación de Ca^{2+} intracelular de neuronas hipocámpales sometidas a OGD y aplicación de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5. Panel superior SEQ ID NO: 4 A. Registro obtenido de 10 neuronas por la lectura de las imágenes de Ca^{2+} sin OGD. B. Análisis estadístico de neuronas sin OGD se presentan los porcentajes de respuesta a cada estímulo. C. presenta la relación de la fluorescencia máxima obtenida por cada estímulo y se compara con respecto al ingreso de iones por el NMDAR. Panel inferior SEQ ID NO: 5 D. Registro obtenido de 10 neuronas por la lectura de las imágenes de Ca^{2+} con realización de OGD. E. Análisis estadístico de neuronas con OGD se presentan los porcentajes de respuesta a cada estímulo. F. presenta la relación de la fluorescencia máxima obtenida por cada estímulo y se compara con respecto al ingreso de iones por el NMDAR

Figura 9 Determinación de Ca^{2+} intracelular de neuronas hipocámpales sometidas a OGD, con aplicación de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 en la fase de recuperación. Panel superior SEQ ID NO: 4 A. Registro obtenido de 10 neuronas por la lectura de las imágenes de Ca^{2+} sin OGD. B. Análisis estadístico de neuronas sin OGD se presentan los porcentajes de respuesta a cada estímulo. C. presenta la relación de la fluorescencia máxima obtenida por cada estímulo y se compara con respecto al ingreso de iones por el NMDAR. Panel inferior SEQ ID NO: 5 D. Registro obtenido de 10 neuronas por la lectura de las imágenes de Ca^{2+} con realización de OGD. E. Análisis estadístico de neuronas con OGD se presentan los porcentajes de respuesta a cada estímulo. F. presenta la relación de la fluorescencia máxima obtenida por cada estímulo y se compara con respecto al ingreso de iones por el NMDAR

Figura 10 Análisis por inmunquímica de las neuronas sometidas a OGD. Número superiores negros marcan los carriles que corresponden a: 1. Marcado de peso molecular, 2. Control de neuronas con OGD, 3. Neuronas con OGD con presencia del péptido SEQ ID NO:4, 4. Neuronas con OGD y aplicación del péptido en SEQ ID NO:4 en la recuperación, 5. Neuronas con OGD con presencia del péptido SEQ ID NO:5, 6.

Neuronas con OGD y aplicación del péptido en SEQ ID NO:5 en la recuperación. Los números rojos marcan las bandas encontradas. Los números de la izquierda presentan los pesos moleculares de kDa del marcador de peso. En el primer recuadro se presentan las bandas encontradas con anti-espectrina, encontrándose el fragmento completo de la espectrina (280kDa), y los fragmentos SBDP 150 (150kDa) y SBDP 120 (120kDa). En el segundo recuadro se presentan las bandas obtenidas con anti-GluN1 (120kDa). En el tercer recuadro se presentan las bandas con anti-actina de la actina (38kDa). El recuadro final presenta las bandas obtenidas con anti-caspasa 3 que corresponden el segmento de la caspasa clivada-17 (17kDa).

Figura 11 Análisis estadístico de los resultados de la determinación por inmunoquímica de diferentes proteínas relacionadas con los procesos de excitotoxicidad por Ca^{2+} . Las columnas rojas corresponden al control que son las neuronas sometidas a OGD y recuperación. La columna amarillo oscuro corresponden a las neuronas sometidas a OGD con presencia del péptido SEQ ID NO:4. Las columnas amarillo claro, corresponden a neuronas con OGD y aplicación del péptido SEQ ID NO:4 en la recuperación. Las columnas de color verde oscuro corresponden a neuronas con OGD en presencia del péptido SEQ ID NO:5. Las columnas de color verde claro corresponden a las neuronas con OGD y aplicación del péptido SEQ ID NO:5 en la recuperación. Los asteriscos indican el grado de significancia de cada porcentaje. A. corresponde a los resultados de espectrina. B corresponde a los porcentajes de SBPD 150, C corresponde a la identificación de SBDP 120, D. Presenta los resultados de la caspasa 3 en su fragmento clivado 17, y E presenta los resultados de la identificación de GluN1.

Breve Descripción de la invención

La presente invención está enmarcada en el campo de péptidos sintéticos antagonistas del NMDAR con efecto de neuroprotección sobre neuronas hipocampales de cultivo primario sometidas a privación de oxígeno-glucosa (OGD) o modelo *in-vitro* de isquemia.

El primer péptido sintético que presenta esta invención tiene como secuencia GEDDLQANQDLIRDKSN (SEQ ID NO: 4, presentado en la lista de secuencias), correspondiendo en código de tres letras a la secuencia Gly-Glu-Asp-Asp-Leu-Gln-Ala-

Asn-Gln-Asp-Leu-Ile-Arg-Asp-Lys-Ser-Asn ordenado desde el N-terminal al C-terminal. El péptido tiene un peso molecular de 1930.98 g/Mol, es principalmente de naturaleza hidrofílica y de carácter ácido.

El segundo péptido sintético que se presenta en esta invención tiene como secuencia GEDDLQDMQDLIRDKSN (SEQ ID NO: 5, presentado en la lista de secuencias), correspondiendo en código de tres letras a la secuencia Gly-Glu-Asp-Asp-Leu-Gln-Asp-Met-Gln-Asp-Leu-Ile-Arg-Asp-Lys-Ser-Asn ordenado desde el N-terminal al C-terminal. El péptido tiene un peso molecular de 1992.09 g/Mol, es principalmente de naturaleza hidrofílica y de carácter ácido.

En esta invención para el péptido que se presenta como SEQ ID NO: 1 corresponde a la secuencia de la Conantoquina G (Con-G) que corresponde al código PDB:1ONU (22). En el péptido que se presenta como SEQ ID NO: 2, se ha reemplazado los cinco residuos del aminoácido modificado γ -carboxiglutámico (Gla), presentes en la Conantoquina-G (posiciones 3, 4, 7, 10 y 14) por el aminoácido aspartato (Asp) de forma que toda la secuencia SEQ ID NO: 2 contiene aminoácidos estándar. Para el péptido que se presenta como SEQ ID NO: 3, tiene las mismas modificaciones descritas en SEQ ID NO: 2, y adicionalmente se ha sustituido la Leu 5 por Tyr, y Asn 8 por Ala. Para el péptido que se presenta como SEQ ID NO: 4, tiene las mismas modificaciones descritas en SEQ ID NO: 2, y adicionalmente se ha sustituido Asp 7 por Ala. Para el péptido que se presenta como SEQ ID NO: 5, tiene las mismas modificaciones descritas en SEQ ID NO: 2, y adicionalmente se ha sustituido Asn 8 por Met.

Así mismo, los residuos C-terminal de cada uno de los péptidos SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, y SEQ ID NO: 5 no están amidados como en la conantoquina-G.

Los péptidos de las secuencias SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, se sintetizaron con la metodología de Síntesis de Péptidos en Fase Sólida (SSPS) (23) (91), empleando como grupo protector el basicolábil fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) (24)(25). las secuencias SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 fueron caracterizados por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) analítica fase reversa, en un gradiente de concentración del 0% al 70% de acetonitrilo (ACN, MERCK) con 0,05%TFA (MERCK, por un tiempo de 67 minutos y un flujo de 1mL/min; se inyectaron 0,2mg/mL de muestra en agua– 0,05% TFA.

Adicionalmente, se empleó MALDI-TOF-MS para determinar el peso molecular de las secuencias SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5. Para la determinación de la estructura secundaria, se empleó el método de dicróismo circular (CD), usando el espectropolarímetro JASCO J-810 (JASCO Company, Japón) entre 190nm a 260nm.

Como resultado de este proceso obtienen los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 con una pureza mayor al 98%, con una tendencia a tener un segmento central en estructura de α -hélice con extremos predominantemente en estructura al azar, altamente hidrofílicos y de gran estabilidad a la temperatura ambiente.

La evaluación electrofisiológica mediante la técnica de "Patch Clamp" (26) en configuración de célula completa (Whole Cell), fijando el voltaje a -60 mV (Voltage Clamp) permite identificar el efecto de estos nuevos péptidos SEQ ID NO: 4 como SEQ ID NO: 5, sobre la actividad del NMDAR, analizando los cambios de corrientes evocadas por el agonista Glutamato y el coagonista Glicina en el NMDAR, en ausencia y presencia de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, cada uno por separado. Los registros se realizaron sobre línea celular de TsA201 o HEK 293T, las cuales previamente se habían transfectado para expresar el NMDAR en la condición GluN1-GluN2B. La concentración de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 fue de 1000 μ M, 500 μ M, 50 μ M, 10 μ M, 1 μ M y 0.1 μ M.

El porcentaje de inhibición de la corriente del péptido presentado como SEQ ID NO: 4 a las concentraciones de 1000 μ M y 500 μ M es del 85.7% y para el péptido presentado como SEQ ID NO: 5 a las concentraciones de 1000 μ M, 500 μ M y 50 μ M es del 92.6%. En las otras concentraciones de los péptidos se observó que con las disminuciones en la concentración del péptido también se da la disminución en el porcentaje de bloqueo de la corriente, hasta que en la concentración de 0.1 μ M no se registró el efecto antagónico. Comparado los resultados de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 con el porcentaje de inhibición reportado por el péptido identificado como SEQ ID NO: 1 que corresponde a la secuencia de Con-G, se observa que el porcentaje de inhibición es similar al porcentaje al reportado del 91.3%, también es similar al porcentaje reportado para otras conantoquinas naturales, como la Con-Br que es del 95% y Con-T que es del 94.5% de inhibición de la corriente (27). El valor identificado de IC_{50} para la secuencia SEQ ID NO: 1 es de 0.1 μ M, mientras que el valor establecido para SEQ ID NO: 4 es de

49.37 μM y para SEQ ID NO: 5 es de 4.34 μM , demostrando estos valores de IC_{50} la disminución en la afinidad de los péptidos SEQ ID NO: 4 y 5 comparados con la SEQ ID NO: 1 (Con-G). Sin embargo, el efecto antagónico SEQ ID NO: 4 y 5 comparados con la SEQ ID NO: 1 (Con-G) se mantiene similar en el porcentaje de bloque de la corriente, esto se puede explicar por las variaciones de aminoácidos introducidos a las secuencias.

Con relación al péptido con la secuencia reportada como SEQ ID NO: 2 que están directamente relacionadas con las SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 presentando solo la variación en un residuo aminoacídico. Se tiene que las secuencias SEQ ID NO: 4 y 5 presentan efecto antagónico y permiten la recuperación de la corriente evocada por el NMDAR después de retirar el péptido. Al comparar las SEQ ID NO: 4 y 5 con la SEQ ID NO: 2 se evidenció que los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 presentan un mayor porcentaje de efecto antagónico que la secuencia SEQ ID NO: 2. De acuerdo a los resultados del acoplamiento molecular se evidencia que las interacciones entre el NMDAR y las SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 tienden a ser interacciones electrostáticas, entre las cuales se encuentran los puentes de hidrógeno los cual explica el efecto antagónico y la capacidad de recuperar la corriente mediada por el NMDAR.

La secuencia SEQ ID NO: 3, está relacionada con las secuencias SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, porque están diseñadas con base en el péptido SEQ ID NO: 1, presentando los péptidos SEQ ID NO: 4 y 5 la variación de dos aminoácidos con respecto de la secuencia SEQ ID NO: 3. El porcentaje de inhibición de la corriente es mayor para los péptidos con las secuencias SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 comparado con la inhibición registrada para la secuencia SEQ ID NO: 3, estas secuencias permiten la recuperación de la corriente de NMDAR al retirar el péptido.

En la comparación de la IC_{50} de los péptidos SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, se observó una mayor afinidad de los péptidos SEQ ID NO: 4 y 5 porque la IC_{50} para SEQ ID NO: 4 es de 49.37 μM y SEQ ID NO: 5 es de 4.34 μM , mientras que para la secuencia SEQ ID NO: 2 el IC_{50} es de 242 μM y para SEQ ID NO: 3 de 176 μM respectivamente (28).

En la determinación de la especificidad entre las subunidades GluN2A y GluN2B, se efectuaron ensayos electrofisiológicos sobre células TsA 201 o HEK 293-T transfectadas

con el NMDAR en las condiciones GluN1-GluN2A y GluN1-GluN2B. Se destaca el efecto antagonista de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 sobre la corriente evocada por el NMDAR en la condición GluN1-GluN2B, porque a una concentración de 50 μ M de péptido se observó efecto antagónico menor sobre la corriente mediada por el NMDAR en la condición GluN1-GluN2A en comparación con el registrado para la condición GluN1-GluN2B. Para el péptido SEQ ID NO: 4 fue del 52.8% de inhibición, el cual es similar al porcentaje de inhibición obtenido sobre la subunidad GluN2B en la misma concentración. Para la secuencia SEQ ID NO: 5 fue 53.4% de inhibición, menor a lo registrado en esa misma concentración en la condición de GluN2B que fue de un 82% de inhibición.

El efecto antagonista generado por los péptidos (SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5) hacia ambos tipos de subunidades GluN2A y GluN2B, indican que la Leu 5 y Asn 8 son residuos importantes para discriminar entre subunidades, porque la secuencia SEQ ID NO: 5 presenta el cambio en el Asn 8 por Met motivo por el cual el porcentaje de inhibición de la corriente en la condición GluN1-GluN2A es menor que en la condición GluN1-GluN2B (29)(13).

Para la evaluación electrofisiológica de como estos nuevos péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 afectan las corrientes excitatorias postsinápticas (EPSC) se empleó la técnica de "Patch Clamp" (26) en configuración de célula completa, fijando el voltaje a -70 mV, se realizaron los registros sobre neuronas hipocampales de cultivo primario de rata y ratón. Los registros de electrofisiológicos de EPSC permiten conocer el estado fisiológico de las neuronas, evidenciándose procesos de sinápticos continuos y duraderos que aportan a la plasticidad sináptica (30)(31). De acuerdo con lo anterior, se puede establecer que sobre neuronas hipocampales el efecto inhibitorio de la amplitud de la corriente de EPSCs de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 es un 50% de inhibición de la corriente de EPSC. De acuerdo con lo reportado el péptido SEQ ID NO: 1 (Con-G) presenta, alrededor de un 30% de inhibición de la corriente de EPSC. En este caso se observa como el porcentaje de inhibición de la corriente de EPSC generado por los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 es menor que el reportado para las conantoquinas naturales Con-T y Con-R (32) (33).

Para evaluar el porcentaje de citotoxicidad de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 se empleó la prueba de Bromuro de 3(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT),

usando los péptidos en diferentes concentraciones, evidenciándose que en el rango de 500 a 300 μM para el péptido con la secuencia SEQ ID NO: 4 no presentan alta significancia en la disminución de la viabilidad celular y en el rango de 100 a 1 μM se presentó disminución de la viabilidad hasta en un 50%. Para la secuencia SEQ ID NO: 5 se evidenció que en las concentraciones entre 1000 a 500 μM se disminuye significativamente la viabilidad celular, mientras que en el rango de concentración de 300 a 1 μM no hay un alto porcentaje de disminución de la viabilidad celular.

Para relacionar el efecto antagonista de los péptidos de las secuencias SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, con el flujo de iones calcio al interior de la célula, se realizan lecturas de calcio intracelular, por medio de ensayos de imágenes de calcio subcelulares, de acuerdo con el protocolo de lectura de imágenes de calcio con Fura-2 (34) sobre neuronas hipocampales de cultivo primario. Estas neuronas hipocampales son sometidas a privación de oxígeno-Glucosa (OGD) durante 90 minutos e incubación a 37°C en una cámara hermética (Modular incubator chamber, Billups Rothenberg) saturado con la mezcla de gases N₂-CO₂ (95%-5%).

Las tres condiciones que se establecieron para la OGD fueron: (I) Neuronas hipocampales sin aplicación de los péptidos de secuencia SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 y sometidas a OGD y recuperación de OGD. (II) Neuronas hipocampales sometidas a OGD y aplicación de los péptidos de secuencia SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, sin estar los péptidos en la recuperación. (III) Neuronas hipocampales sometidas a OGD sin aplicación de los péptidos, luego proceso de recuperación con aplicación de las secuencias SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.

Se observa una alta movilización de calcio a nivel citoplasmático y la relación de la fluorescencia permite establecer un efecto de neuroprotección en las neuronas sometidas a OGD. En las condiciones establecidas las secuencias de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 permiten modular al NMDAR disminuyendo el exceso de calcio que ingresa a la célula por este receptor y evitando los procesos excitotoxicidad mediados por calcio.

Estos resultados permiten evidenciar que las variaciones en algunas posiciones de aminoácidos introducidas en la secuencia de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 con respecto al péptido SEQ ID NO: 1, permiten tener un efecto antagónico sobre los NMDAR sinápticos y extra sinápticos. La primera evidencia de esta variación fue la

variación en la amplitud de corriente de las EPSCs generadas por SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, porque los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 afectan directamente el ingreso de los iones Ca^{2+} a las neuronas, lo cual, podría alterar las vías de señalización mediadas por el ión calcio, modificando la plasticidad sináptica en neuronas saludables (35), aunque es una aproximación a su efecto de neuroprotección, al ser aplicado a neuronas con hiperfunción del NMDAR en algunas patologías (36)(37).

Por medio de Westerns blot (38) se evaluó el cambio en la expresión de proteínas relacionadas con el NMDAR, específicamente en las subunidades GluN1-GluN2B, así como proteínas relacionadas con vías de muerte celular, los anticuerpos primarios fueron caspasa 3-clivada anti-conejo (1:5000), espectrina anti-ratón (1:5000), anti GluN1a (1:2000) anti-conejo y anti-actina (1:20000) anti-ratón.

A partir de análisis por densitometría de los Westerns Blot, se establece variación en la cantidad de proteína expresada, en especial se confirma la presencia de NMDAR en las neuronas hipocampales de cultivo primario, por ende, el efecto de neuroprotección es posible cuando las secuencias SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, no permiten el clivaje de la caspasa-3, es decir no se forman los fragmentos de menor peso molecular de 17KDa y 12KDa (39)(40). Estos fragmentos de la casapasa-3 son los encargados del rompimiento de una proteína denominada espectrina en dos fragmentos de 150 KDa y 120KDa, siendo el fragmento de 120 KDa una marca de la acción de la casapasa-3 clivada.

La espectrina (α -fodrina) es una proteína que interactúa con el dominio c-terminal del NMDAR, permitiendo así el anclaje al citoesqueleto por su unión con la actina y la interacción con proteínas de la densidad postsináptica como la PSD-95. Al ser fragmentada la espectrina se perdería el anclaje del NMDAR al citoesqueleto y por ende el NMDAR tendería a no estar presente en la membrana. Es evidencia de un proceso de neuroprotección de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 que al estar presentes en el proceso de OGD o en el proceso de recuperación de OGD, se disminuye la presencia de la caspasa-3 clivada, motivo por el cual tiende a disminuir el fragmento de la espectrina de 120KDa, además se observa la presencia de la proteína GluN1a dentro de la membrana celular (41) (42).

Los resultados obtenidos de los ensayos *in-vitro* de las secuencias SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, permiten evidenciar el efecto antagonista generado sobre la corriente evocada por el NMDAR y permiten observar como las secuencias SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, generan procesos de neuroprotección sobre neuronas hipocampales sometidas al modelo de OGD, permitiendo regular el flujo de iones calcio a través del NMDAR y evitando la activación de las vías de muerte celular relacionadas con la excitotoxicidad por calcio. De acuerdo con las evidencias expuestas, estos nuevos péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 tienen alto potencial farmacológico en el manejo de la excitotoxicidad mediada por el ión calcio (Ca^{2+}).

1. Descripción Detallada de la Invención

1.1 Síntesis de las secuencias SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5

En la evaluación funcional de los péptidos sintéticos diseñados a partir de la secuencia de la Conantoquina-G, presentada en la lista de secuencias como SEQ ID NO: 1, se tiene el diseño de dos nuevas secuencias denominadas en la lista de secuencias como SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, las cuales son sintetizadas en la metodología SSPS (23), purificadas por ensayos cromatográficos de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en fase reversa y determinación de la masa por MALDI-TOF-MS, obteniéndose péptidos con un porcentaje de pureza mayor del 97% (figura 1).

1.2 Evaluación electrofisiológica de las secuencias SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5

Para evaluar el efecto de las secuencias SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 sobre la corriente generada por el NMDAR, es necesario efectuar la expresión del NMDAR en la condición GluN1a:GluN2B sobre la línea celular TsA 201 o HEK 293-T, lo anterior permitió obtener células que expresaban el receptor, luego ante la presencia del Glutamato 1000 μM y Glicina 100 μM se activaba la corriente propia del NMDAR.

El porcentaje de inhibición de la corriente de NMDAR generado por la secuencia SEQ ID NO: 4 (figuras 2 y 3) es significativo si se toman las concentraciones de péptido de 1000 μM , 500 μM y 50 μM , mientras que las concentraciones de 10 μM , 1 μM y 0,1 μM ya no son significativas y el efecto antagónico no es evidente. Para el péptido de secuencia

SEQ ID NO: 5 (figuras 2 y 4) el porcentaje de inhibición de la corriente del NMDAR es significativo en los puntos de concentración de 1000 μM , 500 μM , 50 μM , 10 μM , 1 μM y sólo en la concentración de 0.1 μM no es significativo y no se evidencia efecto antagónico sobre el NMDAR.

Al comparar entre las secuencias SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 (figura 2) se tiene que en las concentraciones de 1000 μM , 500 μM y 0.1 μM no hay diferencia significativa, sin embargo, en las concentraciones de 50 μM , 10 μM y 1 μM se evidencia diferencia significativa en el porcentaje de inhibición de la corriente, siendo a estas concentraciones mayor la inhibición de la secuencia SEQ ID NO: 5 en comparación del SEQ ID NO: 4.

Lo cual se podría explicar por la variación que existe en su secuencia de aminoácidos, presentando estas secuencias la variación del aminoácido Gla por el Asp y entre ellas la variación se da específicamente en los aminoácidos de las posiciones 7 y 8 presentando el péptido SEQ ID NO: 5 un residuo de Met que no se encuentra presente en SEQ ID NO: 4. El efecto antagónico mostrado por SEQ ID NO: 5 es más eficaz y potente con respecto a SEQ ID NO: 4 (Figuras 2, 3, 4). Al tiempo el SEQ ID NO: 4 tiene un mejor efecto antagónico que el SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 (43). El porcentaje de inhibición de la corriente del péptido SEQ ID NO: 4 a las concentraciones de 1000 μM y 500 μM es del 85.7% y para SEQ ID NO: 5 a las concentraciones de 1000 μM , 500 μM y 50 μM es del 92.6%, siendo similar al porcentaje de inhibición reportado para las Conantoquinas naturales, para la Con-G SEQ ID NO: 1 del 91.3 %, Con-Br del 95% y Con-T 94.5% de inhibición de la corriente (44).

1.3 Determinación de IC₅₀

En la determinación de la IC₅₀ (figura 5) de los péptidos se estableció que para el péptido SEQ ID NO: 4 es de 49.37 μM y para SEQ ID NO: 5 es de 4.34 μM , comparadas entre sí, el péptido SEQ ID NO: 5 tiene un efecto antagonista más eficaz y potente que el SEQ ID NO: 4. Al tiempo, las IC₅₀ de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 muestran una mayor afinidad por el NMDAR al ser comparadas con la IC₅₀ con la registrada para los péptidos SEQ ID NO: 2 (IC₅₀ de 242 μM) y SEQ ID NO: 3 (IC₅₀ de 176 μM) (43) notándose que la IC₅₀ es menor para los péptidos SEQ ID NO: 4 y 5. Sin embargo, al ser comparada la IC₅₀ de los péptidos SEQ ID NO: 4 y 5 con la IC₅₀ para la SEQ ID NO: 1 se tiene que es menor la afinidad porque la IC₅₀ de la SEQ ID NO: 1 es de 0.1 μM .

Lo anterior se puede explicar porque en el diseño de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 no introducen los residuos del aminoácido Gla presente en la SEQ ID NO:1, que posiblemente sean los responsables de la mayor eficacia como antagonistas y por ende presentar una menor IC_{50} , aunque el aminoácido Gla no es indispensable en su unión al receptor, porque en los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 se evidenció el efecto antagónico a pesar de cambiar el aminoácido Gla por Asp.

Lo cual estaría contradiciendo los reportes, en donde, se encontraba que la sustitución del Gla 3 o el Gla 4 con alanina, serina o fosfoserina produce un conopéptido sin actividad antagonista del NMDAR, en este caso las SEQ ID NO: 4 y 5 presentan variación de Gla 3 y Gla 4 por Asp y se registró actividad antagónica. Por el contrario, el Gla 7, Gla 10 o Gla 14 pueden reemplazarse sin pérdida de la capacidad de ser antagonistas pero con disminución de la actividad biológica, es decir disminución del porcentaje de bloqueo de la corriente (45). También evidencia que aunque los grupos carboxilo de los residuos de Gla son probablemente ligandos para los iones de calcio permitiendo la formación de un complejo Con-G-Calcio no es un requerimiento para la actividad antagónica pero si posiblemente para la mayor eficacia y potencia del efecto antagónico (46) (47).

Comparando los IC_{50} de péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 con las conantoquinas de origen natural, las cuales tienen un rango de IC_{50} entre 0.1 a 1 μM , se observa que los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 presentan un IC_{50} mayor que estas, lo cual evidencia que las secuencias diseñadas poseen potencial antagónico, aunque la afinidad es menor que los péptidos de origen natural. Un residuo que podría ser determinante del efecto antagónico de las conantoquinas, especialmente de la Con-G es el residuo de Leucina (Leu) en la posición 5, el cual se ha establecido como determinante del efecto antagónico y que en el diseño de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 no se ha modificado (48).

También, Los estudios de estructura y función hasta la fecha han implicado que el N-terminal de Con-G (SEQ ID NO: 1) es particularmente importante para la unión al receptor, porque se encuentran los residuos que pueden ser importantes en el antagonismo, especialmente la Asn 17 la cual está amidada, sin embargo, en los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 se encuentra la Asn sin ser amidada y este

podría ser otro de los residuos claves en el cambio de la IC_{50} y por tanto en la interacción con el receptor (49) (50).

1.4 Ensayos electrofisiológicos EPSC en neuronas hipocampales

En los registros de EPSC de las neuronas hipocampales se observó la ocurrencia de EPSC frecuentes, de amplitudes y cursos temporales de neuronas con sinapsis saludables, sin embargo, después de la aplicación de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 se observó una disminución en la amplitud de estas corrientes mediadas por el NMDAR (figuras 6^a y 6B). Al efectuar la medición de EPSC en presencia del vehículo, que para ambos casos es agua, no se evidenció efecto ni cambio en la EPSC (Figura 6C).

De acuerdo con la amplitud de las corrientes en el estado basal y después de la aplicación de los péptidos se identificó que ambos péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 tienen un efecto significativo en la disminución de la amplitud de la corriente de la EPSC, así como entre estos no se observa una variación significativa en el efecto, se evidenció que el vehículo en el que se encontraban disueltos los péptidos no genera variación sobre las EPSC por lo cual su acción es no significativa, sin embargo comparado con el efecto de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 si presenta una diferencia significativa (figura 6D).

Estas variaciones en las EPSCs mediadas por el NMDAR en presencia de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 son una evidencia de su efecto antagónico, el cual varía la unión con el neurotransmisor y al tiempo varía el flujo de iones Ca^{2+} (31), en este caso, el flujo de iones estaría disminuyendo al observarse una disminución en la amplitud de la corriente. El flujo de iones Ca^{2+} es relevante en la supervivencia neuronal porque orientan la plasticidad neuronal y directamente los procesos de LTP, motivo por el cual están involucrados en diferentes patologías originadas por la hiper o hipo función del NMDAR.

Este efecto de disminución de las EPSCs mediadas por el NMDARs sinápticos y extra sinápticos ha sido reportado con anterioridad, en donde la aplicación de las conantoquinas cambia la corriente generada, lo cual modifica la respuesta intracelular al variar la cascada de señalización relacionada con CREB porque modifica las proteínas y elementos regulatorios de CREB dependiente de AMPc (51).

De acuerdo con lo anterior, se puede establecer que sobre neuronas hipocampales el efecto inhibitorio de la amplitud de la corriente de EPSCs de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 es cercana a la de la Con-G, el cual es alrededor de un 30% de inhibición de la corriente de EPSC, mientras que los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 presentan un 50% de inhibición de la corriente de EPSC, al mismo tiempo, este porcentaje de inhibición es menor que el reportado para las conantoquinas naturales Con-T y Con-R. Estos resultados permiten evidenciar que las variaciones introducidas en la secuencia permiten tener un efecto antagónico sobre los NMDAR sinápticos y extra sinápticos. Esta variación en la amplitud de corriente de las EPSCs generadas por los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, afectan directamente el ingreso de los iones Ca^{2+} a las neuronas, lo cual, podría alterar las vías de señalización mediadas por Ca^{2+} , modificando la plasticidad sináptica en neuronas saludables (139), sin embargo, es una aproximación a su efecto de neuroprotección, al ser aplicado a neuronas con hiperfunción del NMDAR en algunas patologías (35)(36)(44).

1.5 Evaluación de citotoxicidad de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5

El primer ensayo de citotoxicidad de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 es realizado sobre la línea celular tsA201 o HEK293T en la cual se realizó la expresión del NMDAR en la condición GluN1:GluN2B, con este ensayo se realiza una aproximación a la selectividad de los péptidos por el receptor.

Se identifica que los péptidos reconocen y actúan sobre el NMDAR expresado, porque en el control negativo se presenta la mayor viabilidad celular y en las expuestas a los tratamientos con los péptidos se presenta disminución en la viabilidad celular, esto sucede porque desde el proceso de transfección las células quedan susceptibles a la acción del calcio que ingresa a la célula por el NMDAR (52), también se evalúa el efecto de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 en diferentes concentraciones evidenciándose que en la mayor concentración de 1000 μM hay afectación celular y por ende se disminuye la viabilidad, las concentraciones en el rango de 500 a 300 μM para SEQ ID NO: 4 no presentan alta significancia y en el rango de 100 a 1 μM .

Para SEQ ID NO: 5 se evidenció un alto efecto citotóxico en las concentraciones entre 1000 y 500 μM porque se observó una disminución mayor al 50% de las células, las concentraciones entre 300 a 1 μM aunque presentan significancia estadística no afectan en menos del 50% de la viabilidad celular. Comparando el comportamiento entre SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 se puede decir que, SEQ ID NO: 5 presenta un mayor efecto citotóxico sobre las células que SEQ ID NO: 4, sin embargo, este efecto es esperado porque de acuerdo a la IC_{50} , es mayor la afinidad de SEQ ID NO: 5 que el de SEQ ID NO: 4, afectando la unión del receptor a los péptidos y por ende el ingreso de calcio a las células, se evidenció que las concentraciones por debajo de 500 μM no presentan una alta disminución de la viabilidad ($>50\%$). Con respecto a los péptidos SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 no se puede realizar comparación porque no se efectuaron estudios similares de citotoxicidad sobre las células HEK transfectadas.

En la evaluación preliminar de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 sobre el cultivo primario de neuronas hipocampales se toman dos puntos de concentración de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 de 100 μM y 300 μM tomando como referencia la IC_{50} del péptido SEQ ID NO: 2 y los resultados previos sobre la línea celular tsA201 – HEK293T. Se evidencia que en todos los tratamientos hay acción significativa porque se disminuye la población celular, sin embargo, esta disminución se encuentra dentro del porcentaje esperado de afectación, teniendo en cuenta que se aplican en el DIV 11, en donde la expresión del NMDAR es alta y por lo tanto los cambios en el ingreso de calcio (Ca^{2+}) puede afectar la integridad celular.

1.6 Imágenes de Calcio (Ca^{2+}) intracelular.

El resultado de la medición de Ca^{2+} intracelular, a las neuronas hipocampales de cultivo primario sin aplicación de OGD y sometidos a OGD, con o sin los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 permitió establecer un comportamiento de los incrementos de Ca^{2+} . Es así, como se identificó que las neuronas hipocampales sin estar sometidas a OGD, presentan una concentración de Ca^{2+} intracelular que permite generar un pico definido cuando se expone a la solución de agonistas y luego se retorna a la línea base, aproximadamente el 89.8% de las neuronas responden a los estímulos de agonistas (NMDA/Gly), al exponerse las neuronas a los estímulos de alta concentración de K^{+} , y observándose que las neuronas responden generando picos definidos (figura 7-A,B,C)

La respuesta de las neuronas al estímulo de alta concentración de K^+ es importante porque nos permite verificar que se está midiendo en neuronas y no otro tipo de células. Las neuronas que no responden a los estímulos de K^+ pueden encontrarse en periodos refractarios o hiperpolarizándose nuevamente sin alcanzar a ser registrados dentro del tiempo establecido para captar la emisión (53). Estas mediciones permiten reconocer que las neuronas se encuentran funcionales porque permiten la apertura y cierre de canales, además la respuesta a la solución de agonistas (NMDA/Gly) permiten confirmar que las neuronas están expresando el NMDAR y es de esperar que los péptidos puedan tener efecto.

En los ensayos sobre neuronas hipocampales sometidas a OGD, sin presencia de los péptidos (figuras 7-D,E,F), se observó que después del evento de privación y de recuperación, las neuronas que responden a los estímulos son muy pocas, disminuyéndose al 48% comparadas con las células sin OGD. De estas neuronas aproximadamente la mitad, responden a los estímulos de agonistas y alta concentración de K^+ , notándose un incrementándose en el pico generado por los agonistas, y baja respuesta en los estímulos con la solución de alta concentración de K^+ , en el análisis estadístico se evidenció que la fluorescencia que se registraba por el ingreso de los iones por el NMDAR se incrementó significativamente comparadas con las neuronas sin OGD.

Los ensayos realizados sobre neuronas hipocampales de cultivo primario, a las cuales se les sometió a OGD en presencia de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, y luego se realizó la fase de recuperación, evidenciaron un cambio con la tendencia a recuperar la capacidad de responder a los estímulos de alta concentración de K^+ , notándose respuesta a los estímulos por la formación de picos definidos por cada estímulo (figura 8). Aproximadamente un 90% de neuronas y de estas un 80% responde a los estímulos con agonistas. Comparando los picos de fluorescencia obtenidos a partir del ingreso de Ca^{2+} por NMDAR, se evidencia que estos son notablemente más bajos que los obtenidos para las neuronas sin OGD y las neuronas con OGD, retomándose la respuesta de los estímulos de K^+ en un comportamiento similar a lo observado con las imágenes de Ca^{2+} de neuronas sin OGD.

Los resultados de las neuronas hipocampales de cultivo primario sometidas a OGD y con aplicación de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 en la fase de recuperación, presentan una respuesta continua y con la formación de picos por cada uno de los estímulos (figura 9), en donde, aproximadamente el 84% responden a los estímulos de alta concentración de K^+ , de estas un 58.89% responden a NMDA, con un comportamiento similar a las neuronas sin OGD. Comprando estos resultados con los obtenidos por las neuronas sin OGD, se evidencia similitud en el comportamiento de la respuesta a los estímulos. Comparados con los resultados de neuronas sometidas a OGD, se evidencia un incremento en la respuesta a los estímulos de NMDA y los estímulos de alta concentración de K^+ .

De acuerdo con los resultados obtenidos como porcentaje de respuesta a estímulos de NMDA y estímulos de alta concentración de K^+ , por medio de imágenes de Ca^{2+} intracelular (Tabla 2), se evidencia que, al comparar la acción de los péptidos SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, se tiene que los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 presentan mayores porcentajes de respuesta en las condiciones de ser aplicados durante la OGD, o ser aplicados en la fase de recuperación. Lo anterior estaría demostrando un posible efecto de neuroprotección ante la OGD, porque permite que ante las alteraciones por fallas en el metabolismo energético y en especial a la hiperexcitabilidad de los NMDAR, el efecto antagónico reportado por estos péptidos está contribuyendo a la regulación del ingreso de Ca^{2+} , especialmente los NMDAR extrasinápticos.

Es posible que el mayor efecto en el porcentaje de respuesta medido por la metodología de imágenes de Ca^{2+} , se da por las diferencias entre las secuencias de los péptidos SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 en donde, la diferencias de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 con SEQ ID NO: 2 está en la variación de un residuo de aminoácido y de dos residuos de aminoácidos para el caso de SEQ ID NO: 3. Es de especial interés que en ambas secuencias de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, se conserva la Leu 5, pero el Asn 8 está presente en el péptido SEQ ID NO: 4 y se ha cambiado en el péptido SEQ ID NO: 5 por Met.

El efecto presentado por los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 es similar al efecto determinado para la Con-R y la Con-G, las cuales han llegado a la fase de estudios

preclínicos demostrando efectos positivos en tratamientos de dolor crónico, accidente cerebrovascular y convulsiones (15)(54)(55).

1.7 Efectos en la señalización intracelular por la excitotoxicidad de Ca^{2+} .

De acuerdo con los resultados obtenidos por técnicas inmunoquímicas de la identificación de diferentes proteínas expresadas por las neuronas sometidas a OGD, con o sin presencia de los péptidos SEQ ID NO: 4 y 5, se encontró el segmento completo de la espectrina, los fragmentos de la espectrina (SBDP, spectrin breakdown products) SBDP 150 KDa y SBDP 120 KDa, la subunidad GluN1 del NMDAR y la caspasa-3 clivada (casapasa-17) y de actina como control (figura 10).

En el análisis estadístico se puede establecer los porcentajes obtenidos por densitometría de los diferentes Western Blots, encontrándose que la proteína espectrina completa se presenta en aproximadamente el 60% en el control de OGD. El péptido SEQ ID NO: 4 aplicado en la fase de recuperación de OGD, presenta significancia en el incremento del porcentaje de identificación de la proteína espectrina comparado con el control de OGD, en los otros tratamientos de péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 los resultados del porcentaje de la espectrina son similares al control de OGD.

El fragmento producto de la acción de la caspasa-3 clivada sobre la espectrina, llamado SBDP 150 KDa presenta disminución significativa del porcentaje de identificación en el tratamiento con el péptido SEQ ID NO: 5 durante la OGD. Los demás tratamientos con el péptido SEQ ID NO: 5 no disminuyen significativamente el porcentaje de SBDP 150 KDa. El fragmento de la espectrina SBDP 120 KDa, producto característico de la acción de la caspasa-3 clivada, presenta una disminución significativa del porcentaje de identificación en todos los tratamientos con los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, siendo notorio el efecto del péptido SEQ ID NO: 4 cuando se adiciona en el proceso de recuperación.

La identificación de la caspasa-17 presenta un porcentaje muy similar en todas las condiciones, es decir, solo OGD o aplicación de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 aunque la identificación de esta caspasa clivada se presentaba de manera muy tenue.

Los análisis por densitometría de la determinación de la subunidad GluN1 presenta una proteína muy conservada, no se evidencia cambio en los porcentajes, solo una leve disminución con las neuronas a las cuales se les aplica el péptido SEQ ID NO: 5 en la recuperación, sin embargo, esta disminución no es significativa.

En relación con la actina, con esta proteína se realizó el proceso de normalización para establecer el porcentaje en el cual cada una de las proteínas se encontraban de acuerdo con la condición de las neuronas, sin embargo, se aclarara que en los procesos isquémicos se presenta una acción proteolítica sobre las fibras del citoesqueleto, lo cual lleva a la despolimerización de las cadenas de actina (56).

Los anteriores resultados de la identificación por técnicas inmunoquímicas de la espectrina, la caspasa-3 clivada y los fragmentos SBDP 150 y SBDP 120 KDa, confirman que los procesos de OGD traen como consecuencia un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular vía NMDAR, motivo por el cual se orienta a una cascada de señalización que puede activar enzimas proteolíticas y lipolíticas (entre las que se encuentran proteasas, lipasas, fosfatasas, endonucleasas y calpaínas) y enzimas como la enzima óxido nítrico sintasa (NOs) que incrementa la síntesis de óxido nítrico (NO). Esta sobreactivación conduce al daño en la estructura celular y a la formación de radicales libres y especies reactivas que exacerbaran el daño (57).

Con el conjunto de resultados de las diferentes inmunoquímicas se puede confirmar que la OGD ha presentado una acción de fragmentación de la espectrina (α -fodrina), la cual es una proteína que interactúa con el extremo C-terminal de las subunidades GluN1, GluN2A y GluN2B de NMDAR, conectándolas a filamentos de actina y a proteínas de la densidad postsináptica como la PSD-95 (58).

Este proceso de fragmentación se puede explicar porque la entrada de Ca^{2+} a través de NMDARs provoca una excitotoxicidad que orienta los procesos de muerte neuronal, por vía de necrosis o por la vía de apoptosis, o por ambas (41). En este aspecto se tiene reportada la acción de la calpaína, una enzima proteolítica que actúa principalmente en los procesos de excitotoxicidad por Ca^{2+} , la cual, ante el incremento de este ión, sufre un clivaje generando la enzima activa que se encarga de fragmentar a la espectrina en dos sitios, entre Y1176-G1177 o entre G1230-S1231. Motivo por el cual, cuando la

fragmentación de la espectrina es por la actividad de la enzima calpaína se espera obtener dos fragmentos que son SBDP 150 y SBDP 145 (59)(60).

La otra forma de fragmentar la espectrina es por acción de la caspasa-3 clivada, en general, las caspasas son cisteín proteasas y se relacionan directamente con la muerte neuronal vía apoptosis porque son las encargadas de este proceso, además tiene la capacidad de fragmentar diferentes substratos (61). Permanecen en el citosol de la célula como zimógenos (32kDa) o procaspasas inactivas hasta que se clivan y se forma la caspasa activa (12kDa, 17kDa) (62). En el caso de la espectrina, la caspasa activa puede fragmentarla en dos regiones, entre los aminoácidos D1185-S1186 y D1478-S1479, generando dos productos característicos que se denominan SBDP 150 y SBDP 120, siendo este último fragmento una señal de la acción de la muerte celular mediada por la caspasa-3 (63) (64)(59).

En los resultados de los westerns blotting se detecta la presencia de la espectrina completa y los dos fragmentos SBDP 150 y SBDP 120, por lo tanto, se confirma que el efecto que se identificó en la OGD realizada a los diferentes cultivos fue mediado por la caspasa-3.

Si el efecto de la muerte neuronal es mediado por la acción de la caspasa-3, se puede evidenciar que, con el estudio de esta proteína y su expresión, se encontró una disminución en el porcentaje de la SBDP 120 en todas las aplicaciones con los péptidos en especial en con el péptido SEQ ID NO: 4 cuando se aplica en la recuperación. Esta disminución en la expresión del segmento SBDP 120 estaría relacionado con un posible efecto de neuro protección realizado por los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, lo cual se confirmaría en los resultados obtenidos por las lecturas de imágenes de Ca^{2+} , en donde también se evidencio una mejoría del evento de OGD.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Síntesis de péptidos.

La síntesis de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 fue realizada con la metodología de Síntesis de Péptidos en Fase Sólida (SSPS) (23), empleando como grupo protector el

fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) (24)(25). Para ambos péptidos se emplearon 192,15 mg de resina NovaPEG Rink-Amida Novabiochem (0,49mmol/g), hinchada previamente con Diclorometano (DCM) por 30 minutos. Los aminoácidos empleados en la síntesis son: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asp(Trt)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH y Fmoc-Ser(Tbu)-OH.

Los activadores fueron: Tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU), N,N-Diisopropiletilamina (DIEA), Etilo-2-ciano-2-(hidroxiimino)-acetato (oxyma) y Diciclohexilcarbodiimida (DCC). A partir de estos activadores se generaron las estrategias utilizadas para los acoples.

Al finalizar la síntesis, el péptido es desanclado de la resina, la mezcla de desanclaje estaba formada por 94% de ácidoTrifluoroacético (TFA), 2,5 % de agua grado HPLC, 2,5 % de Etanoditiol (EDT) y 1% de Triisopropilsilano (TIS). Luego se filtró la resina de la mezcla de desanclaje, al filtrado obtenido se le adicionó 4 veces su volumen de éter frío a -20°C x 10 min y se centrifuga a 4°C x 5000rpm x 10 min, se descarta el sobrenadante y al precipitado se le vuelve a adicionar el volumen inicial de éter frío, este procedimiento se repitió 4 veces, en la centrifugación final se descarta el sobrenadante y se deja el precipitado para eliminar por evaporación el éter que queda.

2.2Evaluación funcional de los péptidos.

2.2.1 Expresión de NMDAR (GluN1:GluN2B) en tsA201

Para la expresión de NMDAR se empleó la línea celular tsA201 o HEK293T las cuales expresan constitutivamente el antígeno T grande SV40 para permitir la replicación del plásmido usando el origen SV40 y, por lo tanto, para producir altos niveles de proteínas recombinantes (catálogo Sigma 85120602).

Las células tsA201 se cultivaron en DMEM-F12 (Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10% de SFB (GIBCO; Invitrogen Ltd., Paisley, Reino Unido), 100 U / ml de penicilina (Sigma), 0.1 mg / ml de estreptomycin (Sigma) a 37 °C, 5% de CO₂ y mantenida de acuerdo con los protocolos estándar (65)(66).

La transfección transitoria de subunidades de NMDAR se realizó con 1,1 µg de cDNA (Donación del Dr. Xavier Altafaj, cDNA de GluN1/ GluN2B) y 0.5 µg de GFP, usando reactivo de transfección PEI (1 mg / ml) en una relación 3:1 (PEI: DNA) en DMEN-F12 (Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium) libre de Suero fetal y de antibiótico, con incubación a 37 °C, 5% de CO₂ por 3 horas. Después, el medio con la mezcla de transfección se reemplazó con DMEN-F12 suplementado con 10% de SFB (GIBCO; Invitrogen Ltd., Paisley, Reino Unido), 100 U / ml de penicilina (Sigma), 0.1 mg / ml de estreptomycin (Sigma) adicionando ácido 7-clorokinurénico (7-CK; Tocris-ABCam) ácido 2-Amino-5-fosfonovaleriánico (APV; Tocris-ABCam), para prevenir la toxicidad mediada por NMDAR.

2.2.2 Cultivo primario de neurona hipocampal

Los ensayos con animales fueron realizados en el laboratorio de cultivo celular, grupo de investigación en proteínas de la Universidad Nacional de Colombia. Todos los animales fueron tratados de acuerdo con los lineamientos y en correspondencia con el aval del comité de ética de la Universidad Nacional de Colombia.

También se realizaron ensayos con animales en el laboratorio de Neurofisiología de la Universidad de Barcelona de acuerdo con los procedimientos animales catalanes (Decreto 214/97; Generalidad de Cataluña).

Se realizaron cultivos primarios de neuronas hipocampales a partir de embriones de rata Wistar (250-300 g) de 18 días de desarrollo embrionario (E18). El procedimiento de extracción y el cultivo se efectuó con base a los protocolos establecidos (33)(67). El protocolo empleado es, previo a la extracción de los hipocampos las ratas son sacrificadas mediante inhalación en cámara de CO₂ (~10 min, 15 psi) y posterior dislocación cervical. Luego se realizó cirugía de cesárea para extraer los embriones. Los embriones individuales se colocan en solución salina de Hank (HBSS) (Lonza) y bajo el estereoscopio se comienza a sacar el cerebro de cada espécimen retirando las meninges y separando los hemisferios cerebrales para realizar la extracción de los hipocampos.

Luego se realiza la disociación del tejido utilizando Tripsina al 0,25% (Lonza), se efectúan 2 lavados con 5mL de solución HBSS (Lonza) y 2 lavados con 5mL de medio PNGM (Lonza), finalmente retirar medio y adicionar 1mL de medio PNGM (Lonza), homogenizar y filtrar en malla de 40 μ m (cell strainer, Falcon).

Se realizó el conteo celular con cámara de Neubauer y en cada pozo se siembran 20.000 células en placa de 96 pozos; con anterioridad las cajas de cultivo se cubrieron poli-D-Lisina (Sigma-Aldrich).

2.2.3 Ensayos electrofisiológicos sobre línea celular tsA201 – HEK293T

Los registros electrofisiológicos se efectuaron entre 18 a 24 horas después de la transfección del NMDAR en las células, perfundiendo las células continuamente a temperatura ambiente con una solución extracelular de baño fisiológica: NaCl 140 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1 mM, Glucosa 10 mM y HEPES 10 mM, ajustados a pH 7,42 con NaOH y osmolaridad 304mOsm/Kg. La aplicación del agonista Glutamato (1 mM; Sigma-Aldrich), en presencia del coagonista Glicina (50, Tocris) se realiza mediante una herramienta de rápida aplicación F.A.T el cual está unido a traducción piezoeléctrica (P-601.30; Physik Instrumente), herramienta de aplicación theta-barril hecha de vidrio de borosilicato (1.5 mm de diámetro exterior; Sutter Instruments).

Las corrientes activadas se registraron en la configuración de célula completa (Whole-cell) a un potencial de mantenimiento de -60 mV, adquirido a 5 kHz y filtrado a 2 kHz, por medio del amplificador Axopatch 200B, interfaz Digidata 1440A, y el software pClamp10 (Molecular Devices Corporation). El protocolo de registro emplea la configuración de Gap-free y permite registrar la apertura del canal, la acción antagónica de los péptidos y la respectiva recuperación de la corriente del NMDAR.

Los electrodos se fabricaron de vidrio de borosilicato (1,5 mm de diámetro exterior, 0,86 mm de diámetro interior; Harvard Apparatus), se tiraron con un puller vertical P-97 (Sutter instruments CO) y después pulidas con calentamiento en un MF-830 (Narishige Instruments) para obtener una resistencia final de 3 a 6 megaohmios (M Ω). La solución intracelular contiene CsCl 140 mM, EGTA 5 mM, Na₂ATP 4 mM, Na₃GTP 0.1 mM y HEPES 10 mM, ajustado a pH 7,25 con CsOH y osmolaridad: 298,5mOsm/Kg.

Los péptidos son aplicados con un microinyector IM 300 (Narishige Instruments), con una presión de 1.0 psi por 10 segundos de aplicación. Para la determinación de la IC50 se disuelven los péptidos en diferentes concentraciones (1000 μ M, 500 μ M, 300 μ M, 100 μ M, 50 μ M, 10 μ M y 1 μ M) en presencia de Glu (1000 μ M; Sigma-Aldrich) y Gly (100 μ M, Tocris), con n=9 en cada punto de concentración.

El protocolo de registro se inició la aplicación de la solución control para obtener la línea base, se cambió a la solución de los agonistas para obtener la corriente del NMDAR, luego se realizó la aplicación del péptido SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 en presencia de los agonistas y después se eliminó el péptido, también en presencia de agonistas para permitir la recuperación de la corriente. El tiempo de registro es de alrededor de 2 min, en todas las células se realizan varias aplicaciones del protocolo, finalmente los agonistas fueron eliminados para dejar solo la solución control y recuperar de nuevo la línea base.

El porcentaje de bloqueo se calculó dividiendo la corriente en presencia del péptido (I(SEQ ID NO)) por la corriente de estado estable (steady-state) antes de la aplicación del péptido (I(Glu/Gly)), de acuerdo con la ecuación:

$$\% \text{ de bloqueo de péptido SEQ ID} = [100 - (I(\text{SEQ ID}) / I(\text{Glu/Gly})) \times 100]$$

Ecuación1 Porcentaje de Bloqueo.

2.2.4 Ensayos electrofisiológicos sobre cultivo primario de neuronas hipocampales

Las corrientes excitatorias postsinápticas (EPSC) mediadas por NMDAR dependientes de la actividad espontánea, fueron registradas en cultivos primarios de neuronas del hipocampo entre DIV16 a DIV18, en la configuración de célula completa (Whole-cell) a un potencial de mantenimiento de -70 mV, adquirido a 5 kHz y filtrado a 2 kHz, por medio del amplificador Axopatch 200B, interfaz Digidata 1440A, y el software pClamp10 (Molecular Devices Corporation) (36).

Los registros se realizaron a temperatura ambiente, con una solución extracelular de NaCl 130 mM, KCl 3,5 mM, CaCl₂ 2 mM, glucosa 15 mM, sorbitol 20 mM y HEPES 10 mM, (sin Mg²⁺) ajustado a pH 7,42 con NaOH y osmolaridad 304mOsm/Kg. Para aislar el componente NMDAR, se adicionó 2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo [f]quinoxaline-7- sulfonamide 50 µM (NBQX, Tocris-ABCam) y picrotoxina 100 µM, para bloquear el receptor AMPA y el ácido γ-aminobutírico (GABA) tipo A, respectivamente.

Solución de intracelular contenida K-gluconato 120 mM, KCl 16 mM, NaCl 8 mM, EGTA 0.2 mM, Mg-ATP 2 mM, Na₃-GTP 0.3 mM, sorbitol 20 mM y HEPES 10 mM, ajustado a pH 7.25 con KOH y osmolaridad: 298,5 mOsm/Kg. El QX-314 2.5 mM se incluyó en la solución de pipeta para bloquear el disparo del potencial de acción, la osmolaridad después de QX-314 es 291.1 mOsm/Kg. Las pipetas de registro se fabricaron de vidrio de borosilicato (1,5 mm de diámetro exterior, 0,86 mm de diámetro exterior; Harvard Apparatus), se tiraron con un puller vertical P-97 (Sutter instruments CO) y después pulidas con calentamiento en un MF-830 (Narishige Instruments) para obtener una resistencia final de 3 a 6 megaohmios (MΩ).

El protocolo de registro emplea la configuración de Gap-free y permite registrar la actividad postsináptica por la generación de EPSC. La aplicación de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 se realizó entre los 4 y 5 minutos de registro, estos se disolvieron en agua y la concentración final fue de 150 µM, después de aplicados los péptidos se registra por 4 minutos. También se realizó determinación de EPSC con el vehículo (agua) para verificar que éste no afecta la actividad EPSC entre las neuronas. Para todos los casos se realizó n=5.

2.2.5 Análisis estadístico de los ensayos electrofisiológicos.

Los datos del porcentaje de inhibición de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 se analizaron por regresión y análisis de varianza de un factor mediante Análisis de varianza de un factor (ANOVA), seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni, considerando un nivel de significación de $p < 0.005$, se realizó con GraphPad Prism versión 8.3.0 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California, EE. UU., www.graphpad.com (68).

Los registros electrofisiológicos de pruebas de antagonismo obtenidos con el programa pClamp10 se analizaron para obtener la cinética de bloqueo y desbloqueo, así como la determinación de la IC50 con el programa IGOR Pro 8.04 (Wavemetrics Inc.) con NeuroMatic (Jason Rothman, UCL).

También se usó pClamp10 / Clampfit10.6 (Molecular Devices) para registrar, detectar y analizar la amplitud, el intervalo entre eventos y la transferencia de carga (como área bajo la curva, en pA * ms) desde EPSCs individuales. Seguido de prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni, considerando un nivel de significación de $p < 0.0001$ con GraphPad Prism versión 8.3.0 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California, EE. UU., www.graphpad.com (68).

2.3 Pruebas de citotoxicidad por MTT/MTS.

Para determinar el efecto de citotoxicidad de los péptidos por las células se empleó la prueba de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) y 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) (69), utilizando como control positivo (0% de viabilidad) las células tratadas con SDS 100 µg/mL, y como control negativo (100% de viabilidad) las células solo con medio. Las células con los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 y sin éstos fueron incubadas por 24 horas a 37°C y 5 % de CO₂.

En las células tsA201 transfectadas para la expresión del NMDAR condición GluN1:GluN2B, se aplican los péptidos 24 horas después de la transfección. Los tratamientos corresponden a los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 en un rango de 1000 µM a 1 µM.

Sobre el cultivo primario de neuronas hipocámpales (protocolo de cultivo anteriormente descrito), se adicionó el volumen con suspensión de neuronas para obtener la densidad requerida (20.000 células/pozo) y se completó finalmente a 100µL con medio por pozo, se aplican los péptidos a las células en el día 11 (DIV 11). La concentración de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 es de 100µM y 300µM.

Luego a cada pozo se le adicionan 20 μ l de la solución de MTT (0,5 mg/mL) y se completaron 100 μ l con el medio. Las placas se incubaron durante tres horas a 37 °C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Una vez transcurrido este tiempo, se retiró el sobrenadante y se solubilizan los cristales de formazan con Dimetilsulfóxido (DMSO).

En las pruebas con MTS se adicionan 20 μ l (0,5 mg/mL) y se completaron 100 μ l con el medio. Las placas se incubaron durante tres horas a 37 °C, 5% de CO₂ y 95% de humedad, en este caso no es necesario solubilizar.

Las lecturas de los pozos se realizaron en un lector de Elisa marca Biorad a una λ = 590nm, cada una de las medidas se hizo por triplicado, se aplicó análisis estadístico para interpretación de los datos.

2.4 Modelo de privación de oxígeno y Glucosa (OGD).

Se realizó el cultivo primario de neuronas de hipocampo para las pruebas correspondientes a imágenes de calcio, en este caso el cultivo se realizó en cajas de 4 pozos sobre laminillas de 12 mm previamente tratada con poli-D-Lisina, con una densidad de 100.000 células/pozo. Para las pruebas bioquímicas correspondientes a Western Blotting, el cultivo primario de neuronas hipocampales se realizó en placas de 6 pozos previamente tratados con poli-D-Lisina, con una densidad de 600.000 mil células/pozo.

En el DIV 7 las neuronas de cultivo primario de hipocampo fueron sometidas a condiciones de isquemia durante 90 minutos en incubación a 37 °C, cambiando el medio neuro basal (Gibco) de crecimiento por medio de cultivo DMEM libre de Glc (GIBCO) (hipoglicemia), y ubicándolas en una cámara hermética (Modular incubator chamber, Billups Rothenberg) saturado con la mezcla de gases N₂-CO₂ (95%-5%) (hipoxia). El nivel de O₂ se aseguró empleando un monitor de gas respiratorio (RGM 5250, Datex Ohmeda, Soma Technology, Bloomfield, CT, USA) con lecturas de O₂ entre 1 y 2% y de presión de CO₂ entre 35 y 38 mmHg. Finalizado este periodo de 90 minutos, que se denominó fase de hipoxia (H), se cambió el medio libre de Glc por medio neuro basal, sin realizar lavados intermedios para evitar cualquier perturbación extra a las neuronas, y se procedió a incubar en condiciones normales por 24 horas, periodo de tiempo que se denominó fase de recuperación (R).

Los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 son aplicados a los respectivos cultivos en una concentración de 150 μ M y las condiciones empleadas son: Durante la Deprivación de Oxígeno Glucosa sin estar presente en el proceso de recuperación (OGD+ SEQ ID NO), durante la recuperación sin estar presentes en el proceso de OGD (R+ SEQ ID NO). Se realizó control de OGD sobre cada cultivo y condición empleada, en este caso, se someten a las células a las condiciones de deprivación y recuperación y no se les adicionó los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5. En cada caso, los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 fueron disueltos en el medio correspondiente al tratamiento, es decir, en OGD se disolvieron en el medio libre de Glucosa (Glc) y en recuperación en medio suplementado de crecimiento normal.

2.5 Imágenes de Calcio intracelular.

La determinación de las variaciones de calcio (Ca^{2+}) intracelular, a las neuronas hipocámpales de cultivo primario, sembradas en laminillas, sin ser sometidas a OGD y sometidas a OGD, con o sin la presencia de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, se realizó con la metodología de imágenes de calcio. Se aplicó el protocolo propuesto por Calvo-Rodríguez (34) (70), en el cual, es necesario preparar cuatro soluciones para realizar perfusión de las mismas durante el experimento de imágenes de fluorescencia:

Solución extracelular de buffer salino- HEPES (HBS): NaCl 145 mM, KCl 5 mM, MgCl_2 1 mM, CaCl_2 1 mM, glucosa 10 mM, sodio-HEPES 10 mM a pH 7,42.

Solución salina extracelular libre de Mg^{2+} , en HBS (Mg^{2+} -free): NaCl 146 mM, KCl 5 mM, CaCl_2 1 mM, glucosa 10 mM y HEPES 10 mM a pH 7.42.

Solución extracelular de agonistas de NMDAR en solución Mg^{2+} -free (NMDA/Gly): NaCl 146 mM, KCl 5 mM, CaCl_2 1 mM, glucosa 10 mM y HEPES 10 mM, NMDA 100 μ M y Gly 10 μ M a pH 7.42.

Solución de HBS que contenga KCl en lugar de NaCl (K^+ -high): KCl 145 mM, MgCl_2 1 mM, CaCl_2 1 mM, glucosa 10 mM y HEPES 10 mM a pH 7,42.

La laminilla con las neuronas hipocampales a analizar, fueron incubadas por 45 minutos a 37 °C y 5% CO₂ con 5 µM del indicador quimiofluorescente Fura-2AM en DMSO (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) en el medio de cultivo, evitando la exposición a la luz. Luego se retiró el medio de cultivo y se adicionó la solución de HBS.

Para el registro de las imágenes de Ca²⁺ intracelular, Se empleó un sistema de perfusión de 8 líneas por gravedad equipado con un controlador de válvula para perfundir las soluciones (Automate Scientific Inc., San Francisco, CA, USA). Una bomba de vacío es responsable de eliminar cualquier exceso de medio. La velocidad de la perfusión fue de aproximadamente 1mL/min, las líneas de perfusión se rotulan como línea 1 con solución de HBS, línea 2 con solución Mg²⁺-free, línea 3 con solución de agonistas NMDA/Gly, y línea 4 con solución K⁺-high. Cada una de las líneas es previamente revisada y purgada con agua destilada y desionizada para garantizar el flujo e integridad de cada una.

Se colocó la laminilla en la plataforma de la platina del microscopio invertido y selecciona un campo microscópico utilizando un objetivo 40X. Las longitudes de onda de excitación del Fura-2 (340/380 nm) fueron alternadas cada 0.55 segundos. Se Registró la luz emitida a 520 nm cada 5-10 segundos con una cámara de fluorescencia, que se filtra con un espejo dichroico fura-2. Después se aplicaron las soluciones por perfusión en el siguiente orden, perfusión con solución de HBS, perfusión con la solución de Mg²⁺-free para realizar los lavados entre cada tratamiento (NMDA/Gly o K⁺-high), perfusión con la solución de agonistas NMDA/Gly, perfusiones con solución K⁺-high. Los datos son obtenidos con el software Aguacosmos.

Para el análisis de los registros obtenidos es necesario abrirlos como libros de Excel, recuperando los datos obtenidos como regiones de interés (ROI) correspondientes a neuronas individuales, en cada una de las longitudes de onda de excitación del Fura-2 (340/380 nm). Luego se toman los ROI340 y los ROI380, y se les resta a cada ROI el valor del fondo, para obtener los ROI corregidos. Luego con los ROI corregidos se establece la relación entre ROI340/ROI380 y finalmente cada dato se normaliza con el promedio de los ROI de la relación entre ROI340/ROI380. Para graficar los datos se empleó GraphPad Prism versión 8.3.0 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California, EE. UU., www.graphpad.com (68).

2.6 Western Blot

Las neuronas hipocampales de cultivo primario sembradas en cajas de 6 pozos y sometidas a OGD, con o sin la presencia de los péptidos SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, son sometidas a protocolo de lisis de Gratacós-Batlle (65), en donde, se retira el medio de cultivo y se adiciona 1000 μ L de PBS con Ca^{2+} y Mg^{2+} a temperatura ambiente. Luego se retira el PBS y se adiciona Buffer lisis a pH 7.5 suplementado con PMFS y Coctel de inhibidores de proteasas, se obtienen las células por desprendimiento mecánico y se mantienen en frío (4°C), se centrifuga a 17000 g por 30 min a 4°C , tomándose el sobrenadante. Para determinar la concentración de proteína del sobrenadante, se utilizó el método del ácido bicinonínico en microplacas, utilizando como patrón albúmina sérica bovina (BSA) (71). La lectura se realizó a 562 nm en un lector de microplacas Bio-Rad.

Para el ensayo de transferencia o Western Blot, se realiza electroforesis SDS-PAGE de acuerdo con el método de Laemmli (72) se elaboran geles al 8%, 10% y 15%, se siembran 20 μ g de proteína por pozo de cada una de las condiciones de OGD. Las condiciones de corrido son 130 V y 51mA por 90 min, en una cámara de electroforesis de proteínas marca Bio-Rad (Mini-PROTEAN®).

Para iniciar la transferencia se aplica el protocolo de BioRad (38), en donde, es necesario dejar las almohadillas, la membrana de nitrocelulosa y el gel de electroforesis en el buffer de transferencia por 15 min a temperatura ambiente. Se realiza el montaje del gel y la membrana de nitrocelulosa en la cámara de transferencia teniendo como condiciones finales de transferencia 22 V, 1.3 mA por 10 minutos (BIO RAD Laboratories). El gel de transferencia es teñido con InstantBlue™ durante 12 horas a temperatura ambiente.

La membrana de nitrocelulosa es lavada por 10min con buffer salino Tris-Tween 20 a pH7.5 (TBST), luego la membrana es bloqueada con TBST-BSA 3% por 1h:20 min a temperatura ambiente. Se realiza lavado con buffer (3 veces), se realiza incubación del anticuerpo primario (Tabla 3) durante toda la noche a 4°C en agitación permanente, después se realiza lavado de la membrana con buffer TBST (3 veces), se incuba el anticuerpo secundario por 1 hora a temperatura ambiente y agitación continua. Se lava la membrana con buffer TBTS (3 veces), se realiza revelado con solución de revelado Western Bright™ peroxide/Western Bright™ Quantum (Advansta R-03025-C50 Bio-

Rad). Se realiza lectura con el software de ChemLab. Las imágenes son analizadas con el Software Image LabTM versión 6.0.0 build 25 standard edition © 2017, Bio-Rad Laboratories, Inc (52).

Para las inmunoquímicas de la subunidad GluN1 se realiza el procedimiento de stripping siguiendo el protocolo de Bio-Rad (38), empleando el Stripping Buffer (Thermo Scientific Ref: 21059)

Los datos se analizaron por regresión y análisis de varianza de un factor mediante Análisis de varianza de un factor (ANOVA), seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni, considerando un nivel de significación de $p < 0,05$, se realizó con GraphPad Prism versión 8.3.0 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California, EE. UU., www.graphpad.com (68).

Lista de secuencias de los péptidos presentados en esta invención

Información General

- Numero de secuencias: 2

I. Información para secuencia SEQ ID NO: 4

- a) Longitud: 17
- b) Tipo: aminoácidos
- c) Cadena: solo una cadena
- d) Topología: lineal
- e) Tipo de molécula: péptido
- f) Secuencia: GEDDLQANQDLIRDKSN
 Gly-Glu-Asp-Asp-Leu-Gln-Ala-Asn-Gln-Asp-Leu-Ile-Arg-Asp-Lys-Ser-Asn
5 10 15

II. Información para secuencia SEQ ID NO: 5

- a) Longitud: 17
- b) Tipo: aminoácidos
- c) Cadena: solo una cadena
- d) Topología: lineal

f) Secuencia: GEDDLQDMQDLIRDKSN

.....5 10 15

1. Traynelis, Stephen F., Wollmuth, Lonnie P., MacBain, Chris J., Menniti, Frank S., Vance, Katie M., Ogden, Kevin K., Hansen, Kasper B., Yuan, Hongjie., Myers, Scott J. and DR. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacol Rev* [Internet]. 2010;14(62):405–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2964903/pdf/zpg405.pdf>
2. Yaka R, Salomon S, Matzner H, Weinstock M. Effect of varied gestational stress on acquisition of spatial memory, hippocampal LTP and synaptic proteins in juvenile male rats. *Behav Brain Res*. 2007;179(1):126–32.
3. Karakas E, Furukawa H. Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. *Science*. 2014;344(6187):992–7.
4. Paoletti P, Neyton J. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol*. 2007;7(1):39–47.
5. Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M. NMDA receptor subunits: Diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol*. 2001;11(3):327–35.
6. Karakas E, Regan MC, Furukawa H. Emerging structural insights into the function of ionotropic glutamate receptors. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2015;40(6):328–37.

Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096800041500078X>

7. Lynch DR, Guttman RP. NMDA receptor pharmacology: perspectives from molecular biology. *Curr Drug Targets*. 2001;2(3):215–31.
8. Redolat R, Carrasco MDC, Simón VM. Efectos de la administración aguda de mk-801, antagonista no competitivo de los receptores nmda, sobre la evitación activa en ratones. *Psicothema*. 1998;10(1):135–41.
9. Recio-Pinto E, Castillo C. Peripheral N-methyl-D-aspartate receptors as possible targets for chronic pain treatment. *Tech Reg Anesth Pain Manag*. 2010;
10. Xiao C, Huang Y, Dong M, Hu J, Hou S, Castellino FJ, et al. NR2B-selective conantokin peptide inhibitors of the NMDA receptor display enhanced antinociceptive properties compared to non-selective conantokins. *Neuropeptides*. 2008;
11. Blandl T, Prorok M, Castellino FJ. NMDA-receptor antagonist requirements in conantokin-G. *FEBS Lett*. 1998;
12. Twede VD, Teichert RW, Walker CS, Gruszczyński P, Kaźmierkiewicz R, Bulaj G, et al. Conantokin-Br from *Conus bretinghami* and selectivity determinants for the NR2D subunit of the NMDA receptor. *Biochemistry*. 2009;
13. Gowd KH, Han TS, Twede V, Gajewiak J, Smith MD, Watkins M, et al. Conantokins derived from the *Asprella* clade impart con RI-B, an N-methyl d-aspartate receptor antagonist with a unique selectivity profile for NR2B subunits. *Biochemistry*. 2012;51:4685–92.
14. Klein RC, Prorok M, Galdzicki Z, Castellino FJ. The Amino Acid Residue at Sequence Position 5 in the Conantokin Peptides Partially Governs Subunit-selective Antagonism of Recombinant N-Methyl-D-aspartate Receptors. *J Biol Chem*. 2001;
15. Siegan JB, Hama AT, Sagen J. Suppression of neuropathic pain by a naturally-derived peptide with NMDA antagonist activity. *Brain Res*. 1997;755(2):331–4.
16. Balsara RD, Ferreira AN, Donahue DL, Castellino FJ, Sheets PL. Probing NMDA receptor GluN2A and GluN2B subunit expression and distribution in cortical neurons. *Neuropharmacology*. 2014;
17. Olivera B, McIntosh M, McCabe T, Layer RT, Zhou L-M. Patente US 6,277,825 B1: USE OF CONANTOKNS FOR TREATING PAN. Vol. 1. US; 2001.
18. Watkins AGCJCGRHIMJTLTMMODW. Patente ES2207970T3 [Internet]. 2010. p. 2. Available from: <https://patents.google.com/patent/ES2207970T3/en>
19. McCabe T, Zhou L-M, Layer R, Olivera B, McIntosh M. Patente US 6,399,574 B1:

USE OF CONANTOKINS. Vol. 1. US; 2002. p. 17173–8.

20. Shandler SJ, Gellman SH. Patente US 9 , 782 , 454 B2: HIGHLY ACTIVE POLYPEPTIDES AND METHODS OF MAKING AND USING THE SAME. Vol. 2. US; 2017.
21. REYES-MONTANO EA, REYES-GUZMÁN EA, VEGA CASTRO NA. Patente CO15303915 / WO 2017/109756 A2. 2017. p. 6.
22. Skjærbsek N, Nielsen KJ, Lewis RJ, Alewood P, Craik DJ. Determination of the solution structures of conantokin-G and conantokin- T by CD and NMR spectroscopy. *J Biol Chem*. 1997;272(4):2291–9.
23. Merrifield R. Solid-Phase Peptide Syntheses. *Endeavour*. 1965;24:3–7.
24. Novabiochem. Fmoc resin cleavage protocols. In: Millipore is a division of Fmoc resin cleavage protocols. 2012. p. 2–5.
25. Kates SA, Albericio F. Solid-phase synthesis: a practical guide. Marcel Dekker, editor. New York; 2000. 826 p.
26. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*. 1981;391(2):85–100.
27. Teichert RW, Jimenez EC, Twede V, Watkins M, Hollmann M, Bulaj G, et al. Novel conantokins from *Conus parius* venom are specific antagonists of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem*. 2007;282(51):36905–13.
28. Reyes-Guzman EA, Vega-Castro N, Reyes-Montaña EA, Recio-Pinto E. Antagonistic action on NMDA/GluN2B mediated currents of two peptides that were conantokin-G structure-based designed. *BMC Neurosci*. 2017;18(1):1–13.
29. Dravid SM, Erreger K, Yuan H, Nicholson K, Le P, Lyuboslavsky P, et al. Subunit-specific mechanisms and proton sensitivity of NMDA receptor channel block. *J Physiol*. 2007;581(Pt 1):107–28.
30. Tovar KR, Westbrook GL. Modulating synaptic NMDA receptors. *Neuropharmacology* [Internet]. 2017;112:29–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.08.023>
31. Barth AL, Malenka RC. NMDAR EPSC kinetics do not regulate the critical period for LTP at thalamocortical synapses. *Nat Neurosci*. 2001;4(3):235–6.
32. Beaudoin III GMJ, Seung-Hye L DS, Yang Y Y-GN, Reichardt L.F AJ. Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex. *Nat Protoc*. 2012;7:1741-1754.

33. Longart M, Liu Y, Karavanova I, Buonanno A. Neuregulin-2 is developmentally regulated and targeted to dendrites of central neurons. *J Comp Neurol*. 2004;472(2):156–72.
34. Calvo-Rodríguez M, Villalobos C, Nuñez L. Fluorescence and bioluminescence imaging of subcellular Ca²⁺ in aged hippocampal neurons. *J Vis Exp*. 2015;2015(106):1–8.
35. Benveniste BYM, Clements J, Jrt LV, Mayer ML. A KINETIC ANALYSIS OF THE MODULATION OF N-METHYL-D- ASPARTIC ACID RECEPTORS BY GLYCINE IN MOUSE CULTURED HIPPOCAMPAL NEURONES. *J Physiol* (1990),. 1990;428:333–57.
36. Soto D, Olivella M, Grau C, Armstrong J, Alcon C, Gasull X, et al. L-Serine dietary supplementation is associated with clinical improvement of loss-of-function GRIN2B-related pediatric encephalopathy. *Sci Signal*. 2019;12(586):1–16.
37. Chung C, Marson JD, Zhang QG, Kim J, Wu WH, Brann DW, et al. Neuroprotection Mediated through GluN2C-Containing N-methyl-D-aspartate (NMDA) Receptors Following Ischemia. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(April):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep37033>
38. BIO-RAD SK. General Protocol for Western Blotting. 20:7–8.
39. Fan MMY, Raymond L a. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease. *Prog Neurobiol*. 2007;81(5–6):272–93.
40. Sekiguchi M, Yasufumi A, Ae S, Konno S-I, Kobayashi H, Yoshimi A, et al. Comparison of neuropathic pain and neuronal apoptosis following nerve root or spinal nerve compression. 2009;
41. Zhou M, Baudry M. Developmental changes in NMDA neurotoxicity reflect developmental changes in subunit composition of NMDA receptors. *J Neurosci*. 2006;26(11):2956–63.
42. Limapichat W, Yu WY, Branigan E, Lester HA, Dougherty DA. Key binding interactions for memantine in the NMDA receptor. *ACS Chem Neurosci*. 2013 Feb 20;4(2):255–60.
43. Reyes-Guzmán EA, Reyes-Montaña EA. Diseño y evaluación funcional de péptidos que interactúan con la subunidad GluN2B del receptor NMDA. Universidad Nacional de Colombia.; 2015.
44. Cheriyan J, Balsara RD, Hansen KB, Castellino FJ. Pharmacology of triheteromeric N-Methyl-d-Aspartate Receptors. *Neurosci Lett*. 2016;617:240–6.

45. Zhou L-M, Szendrei GI, Fossom LH, Maccacchini M-L, Skolnick P, Otvos L. Synthetic Analogues of Conantokin-G: NMDA Antagonists Acting Through a Novel Polyamine-Coupled Site. *J Neurochem*. 2002;66(2):620–8.
46. Blandl T, Warder SE, Prorok M, Castellino FJ. Structure-function relationships of the NMDA receptor antagonist peptide, conantokin-R. *FEBS Lett*. 2000;
47. Sheng Z, Dai Q, Prorok M, Castellino FJ. Subtype-selective antagonism of N-methyl-d-aspartate receptor ion channels by synthetic conantokin peptides. *Neuropharmacology*. 2007;
48. Klein RC, Warder SE, Galdzicki Z, Castellino FJ, Prorok M. Kinetic and mechanistic characterization of NMDA receptor antagonism by replacement and truncation variants of the conantokin peptides. *Neuropharmacology*. 2001;41(7):801–10.
49. Chandler P, Pennington M, Maccacchini ML, Nashed NT, Skolnick P. Polyamine-like actions of peptides derived from conantokin-G, an N- methyl-D-aspartate (NMDA) antagonist. *J Biol Chem*. 1993;268(23):17173–8.
50. Carpenter-Hyland EP, Chandler LJ. Adaptive plasticity of NMDA receptors and dendritic spines: Implications for enhanced vulnerability of the adolescent brain to alcohol addiction. *Pharmacol Biochem Behav*. 2007;86(2):200–8.
51. Huang L, Balsara RD, Sheng Z, Castellino FJ. Conantokins inhibit NMDAR-dependent calcium influx in developing rat hippocampal neurons in primary culture with resulting effects on CREB phosphorylation. *Mol Cell Neurosci*. 2010;45(2):163–72.
52. Ing Bio-Rad L. Software Image Lab TM. 2017.
53. Popescu GK. Ionotropic glutamate receptor technologies. *Ionotropic Glutamate Receptor Technologies*. 2015. 1–299 p.
54. Xiao C, Huang Y, Dong M, Hu J, Hou S, Castellino FJ, et al. NR2B-selective conantokin peptide inhibitors of the NMDA receptor display enhanced antinociceptive properties compared to non-selective conantokins. *Neuropeptides* [Internet]. 2008;42(5–6):601–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.npep.2008.09.003>
55. Balsara R, Li N, Weber-Adrian D, Huang L, Castellino FJ. Opposing action of conantokin-G on synaptically and extrasynaptically- activated NMDA receptors. *Neuropharmacology*. 2012;
56. Piccirillo S, Castaldo P, MacRì ML, Amoroso S, Magi S. Glutamate as a potential “survival factor” in an in vitro model of neuronal hypoxia/reoxygenation injury:

Leading role of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Cell Death Dis* [Internet]. 2018;9(7). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-018-0784-6>

57. Alluri H, Shaji CA, Davis ML, Tharakan B. Oxygen-glucose deprivation and reoxygenation as an in vitro ischemia-reperfusion injury model for studying blood-brain barrier dysfunction. *J Vis Exp*. 2015;2015(99):1–5.
58. Wu J-B, Song N-N, Wei X-B, Guan H-S, Zhang X-M. Protective effects of paeonol on cultured rat hippocampal neurons against oxygen–glucose deprivation-induced injury. 2007;
59. Chandran R, Kumar M, Kesavan L, Jacob RS, Gunasekaran S, Lakshmi S, et al. Cellular calcium signaling in the aging brain. *J Chem Neuroanat*. 2019;95(November 2017):95–114.
60. Luo Y, Ma H, Zhou JJ, Li L, Chen SR, Zhang J, et al. Focal cerebral ischemia and reperfusion induce brain injury through $\alpha 2\delta$ -1-bound NMDA receptors. *Stroke*. 2018;49(10):2464–72.
61. Simões AP, Silva CG, Marques JM, Pochmann D, Porciúncula LO, Ferreira S, et al. Glutamate-induced and NMDA receptor-mediated neurodegeneration entails P2Y1 receptor activation. *Cell Death Dis*. 2018;9(3):1–17.
62. Chaabane W, User SD, El-Gazzah M, Jaksik R, Sajjadi E, Rzeszowska-Wolny J, et al. Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: Interdependence between those pathways and effects on cancer. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2013.
63. Salazar MM. Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud Techniques for detecting in vitro apoptosis and cell senescence and their importance in health biotechnology. *Rev Colomb Biotecnol* Diciembre. 2009;XI(2):152–66.
64. Afrazi S, Esmaeili-Mahani S, Sheibani V, Abbasnejad M. Neurosteroid allopregnanolone attenuates high glucose-induced apoptosis and prevents experimental diabetic neuropathic pain: in vitro and in vivo studies. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014;
65. Gratacòs-Batlle E, Olivella M, Sánchez-Fernández N, Yefimenko N, Míguez-Cabello F, Fadó R, et al. Mechanisms of CPT1C-Dependent AMPAR Trafficking Enhancement. *Front Mol Neurosci* [Internet]. 2018;11(August):1–18. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2018.00275/full>
66. Soto D, Coombs ID, Kelly L, Farrant M, Cull-Candy SG. Stargazin attenuates

intracellular polyamine block of calcium-permeable AMPA receptors. *Nat Neurosci.* 2007;10(10):1260–7.

67. J Beaudoin GM, Lee S-H, Singh D, Yuan Y, Ng Y-G, Reichardt LF, et al. Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex. *Nat Protoc.* 2012;7(9).
68. GraphPad. S. GraphPad Prism versión 8.3.0 [Internet]. 2019. p. La Jolla California, EE. UU. Available from: www.graphpad.com
69. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1–2):55–63.
70. Calvo-Rodríguez M, Núñez L, Caballero E, García-Durillo M, Villalobos C. Neurotoxic Ca²⁺ Signaling Induced by Amyloid- β Oligomers in Aged Hippocampal Neurons In Vitro. *Amyloid Proteins Book.* In: Press H, editor. *Amyloid Proteins Methodos and Protocols.* Third Edit. UK; 2004. p. 341–54.
71. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* [Internet]. 1985 Oct [cited 2014 Oct 29];150(1):76–85. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269785904427>
72. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(15):680-685.

Tabla 1. Péptidos obtenidos a partir de la secuencia de las Conatoquinas y modelos de estudio

Documento	Secuencia reportada	Diferencias con péptidos SEQ ID No.4 y 5	IC50 μ M	Modelo de estudio
US6277825B1 (17).	Secuencia 1: Gly Glu Xaa Xaa Leu Gln Xaa Asn. Gln Xaa Leu. Ile Arg Xaa Lys Ser	1. Xaa en los residuos 3 y 4 es ácido gamma carboxiglutámico 2. Xaa en los residuos 7, 10 y 14 puede ser cualquier aminoácido preferiblemente ácido gamma-carboxiglutámico. 3. Con el péptido SEQ ID No. 4 residuo 7 4. Con el péptido SEQ ID No. 5 residuo 8	0.037	Un método para tratar trastornos en los que la fisiopatología implica una excitación excesiva de las células nerviosas por aminoácidos excitadores o agonistas del receptor NMDA relacionadas con dolor en modelos <i>in-vitro</i> de cultivo primario de Ganglio dorsal. También en modelos <i>in-vivo</i> de Parkinson, epilepsia y la incontinencia urinaria.
US6277825B1 (17).	Secuencia 2: Gly Glu Xaa Xaa Tyr Gln Lys Met Leu Xaa Asn Leu Arg Xaa Ala Glu Wall Lys Lys Asn Ala	1. Sintetizado de la secuencia de <i>Conus tulipa</i> 2. Secuencia de 21 aminoácidos 3. Xaa en los residuos 3 y 4 es ácido gamma carboxiglutámico 4. Xaa en los residuos 10 y 14 puede ser cualquier aminoácido preferiblemente ácido gamma-carboxiglutámico. 5. Con el péptido SEQ ID No. 4 residuo 7	0.034	Un método para tratar trastornos en los que la fisiopatología implica una excitación excesiva de las células nerviosas por aminoácidos excitadores o agonistas del receptor NMDA relacionadas con dolor en modelos <i>in-vitro</i> de cultivo primario de Ganglio dorsal.

				También en modelos <i>in-vivo</i> de Parkinson, epilepsia y la incontinencia urinaria.
US6277825B1 (17).	Secuencia 3: Gly Glu Xaa Xaa Val Ala Lys Met Ala Ala Xaa Leu Ala Arg Xaa Asp Ala Val Asn	1. Sintetizado de la secuencia de <i>Conus lynceus</i> 2. Secuencia de 19 aminoácidos 3. Xaa en los residuos 3 y 4 es ácido gamma carboxiglutámico 4. Xaa en los residuos 11 y 15 puede ser cualquier aminoácido preferiblemente ácido gamma-carboxiglutámico. 5. Con el péptido SEQ ID No. 4 residuo 7	0.232	Un método para tratar trastornos en los que la fisiopatología implica una excitación excesiva de las células nerviosas por aminoácidos excitadores o agonistas del receptor NMDA relacionadas con dolor en modelos <i>in-vitro</i> de cultivo primario de Ganglio dorsal. También en modelos <i>in-vivo</i> de Parkinson, epilepsia y la incontinencia urinaria.
US6277825B1 (17).	Secuencia 4: Gly Glu Xaa Xaa Val Ala Lys Met Ala Ala Xaa Leu Ala Arg Xaa Asn Ile Ala Lys Gly Cys Lys Val Asn. Cys Tyr Pro	1. Sintetizado de la secuencia de <i>Conus radiatus</i> 2. Secuencia de 27 aminoácidos 3. Xaa en los residuos 3 y 4 es ácido gamma carboxiglutámico 4. Xaa en los residuos 11 y 15 puede ser cualquier aminoácido preferiblemente ácido gamma-carboxiglutámico. 5. Con el péptido SEQ ID No. 4 residuo 7	0.253	Un método para tratar trastornos en los que la fisiopatología implica una excitación excesiva de las células nerviosas por aminoácidos excitadores o agonistas del receptor NMDA relacionadas con dolor en modelos <i>in-vitro</i> de cultivo

				primario de Ganglio dorsal. También en modelos <i>in-vivo</i> de Parkinson, epilepsia y la incontinencia urinaria.
US6277825B1 (17).	Secuencia 5: Gly Asp Xaa Xaa Tyr Ser Lys Phe Ile Xaa Arg Glu Arg Xaa Ala Gly Arg Leu. Asp Leu Ser Lys Phe Pro	1. Sintetizado de la secuencia de <i>Conus sulcatus</i> 2. Secuencia de 24 aminoácidos 3. Xaa en los residuos 3 y 4 es ácido gamma carboxiglutámico 4. Xaa en los residuos 10 y 14 puede ser cualquier aminoácido preferiblemente ácido gamma-carboxiglutámico. 5. Con el péptido SEQ ID No. 4 residuo 7 6. Con el péptido SEQ ID No. 5 residuo 8	0.30	Un método para tratar trastornos en los que la fisiopatología implica una excitación excesiva de las células nerviosas por aminoácidos excitadores o agonistas del receptor NMDA relacionadas con dolor en modelos <i>in-vitro</i> de cultivo primario de Ganglio dorsal. También en modelos <i>in-vivo</i> de Parkinson, epilepsia y la incontinencia urinaria.
US6277825B1 (17).	Secuencia 6: Gly Glu Xaa Xaa Tyr Arg Lys Ala Met Ala Xaa Leu Glu Ala Lys Lys Ala Gln Xaa Ala Leu Lys Ala	1. Sintetizado de la secuencia de <i>Conus ochroleucus</i> 2. Secuencia de 23 aminoácidos 3. Xaa en los residuos 3 y 4 es ácido gamma carboxiglutámico 4. Xaa en los residuos 11 y 19 puede ser cualquier aminoácido preferiblemente ácido gamma-carboxiglutámico.	0.96	Un método para tratar trastornos en los que la fisiopatología implica una excitación excesiva de las células nerviosas por aminoácidos excitadores o agonistas del receptor NMDA relacionadas con dolor en

		5. Con el péptido SEQ ID No. 4 residuo 7 6. Con el péptido SEQ ID No. 5 residuo 8		modelos <i>in-vitro</i> de cultivo primario de Ganglio dorsal. También en modelos <i>in-vivo</i> de Parkinson, epilepsia y la incontinencia urinaria.
US6277825B1 (17).	Secuencia 7: Gly Ala Lys Xaa Asp Arg Asn Asn Ala Xaa Ala Val Arg Xaa Arg Leu Glu Glu Ile	1. Sintetizado de la secuencia de <i>Conus gloriamaris</i> 2. Secuencia de 19 aminoácidos 3. Xaa en los residuos 4 es ácido gamma carboxiglutámico 4. Xaa en los residuos 10 y 14 puede ser cualquier aminoácido preferiblemente ácido gamma-carboxiglutámico. 5. Con el péptido SEQ ID No. 4 residuo 7 6. Con el péptido SEQ ID No. 5 residuo 8	3.6	Un método para tratar trastornos en los que la fisiopatología implica una excitación excesiva de las células nerviosas por aminoácidos excitadores o agonistas del receptor NMDA relacionadas con dolor en modelos <i>in-vitro</i> de cultivo primario de Ganglio dorsal. También en modelos <i>in-vivo</i> de Parkinson, epilepsia y la incontinencia urinaria.
US6277825B1 (17).	Secuencia 8: Gly Tyr Xaa Xaa Asp Arg Xaa Ile Ala Xaa Thr Val Arg Xaa Leu Glu Glu Ala	1. Sintetizado de la secuencia de <i>Conus characteristicus</i> 2. Secuencia de 18 aminoácidos 3. Xaa en los residuos 3 y 4 es ácido gamma carboxiglutámico 4. Xaa en los residuos 7, 10 y 14 puede ser cualquier aminoácido preferiblemente ácido	>20	Un método para tratar trastornos en los que la fisiopatología implica una excitación excesiva de las células nerviosas por aminoácidos excitadores o agonistas del receptor NMDA

		gamma-carboxiglutámico. 5. Con el péptido SEQ ID No. 4 residuo 7 6. Con el péptido SEQ ID No. 5 residuo 8		relacionadas con dolor en modelos <i>in-vitro</i> de cultivo primario de Ganglio dorsal. También en modelos <i>in-vivo</i> de Parkinson, epilepsia y la incontinencia urinaria.
US6277825B1 (17).	Secuencia 9: Gly Tyr Xaa Xaa Asp Arg Xaa Val Ala Xaa Thr Val Arg Xaa Leu. Asp Ala Ala	1. Sintetizado de la secuencia de <i>Conus quercinus</i> 2. Secuencia de 18 aminoácidos 3. Xaa en los residuos 3 y 4 es ácido gamma carboxiglutámico 4. Xaa en los residuos 7, 10 y 14 puede ser cualquier aminoácido preferiblemente ácido gamma-carboxiglutámico. 5. Con el péptido SEQ ID No. 4 residuo 7 6. Con el péptido SEQ ID No. 5 residuo 8	0.045	Un método para tratar trastornos en los que la fisiopatología implica una excitación excesiva de las células nerviosas por aminoácidos excitadores o agonistas del receptor NMDA relacionadas con dolor en modelos <i>in-vitro</i> de cultivo primario de Ganglio dorsal. También en modelos <i>in-vivo</i> de Parkinson, epilepsia y la incontinencia urinaria.
US6277825B1 (17).	Secuencia 10 a 19 y secuencias 21 a 32: Péptidos de 4 a 7 aminoácidos.	1. Sintetizado de la secuencia de <i>Conus quercinus</i> 2. Secuencia de 4 a 7 aminoácidos 3. Xaa en los residuos 3 y 4 es ácido gamma carboxiglutámico 4. Xaa en los residuos 7 puede ser cualquier	Inactivos	Un método para tratar trastornos en los que la fisiopatología implica una excitación excesiva de las células nerviosas por aminoácidos excitadores o

		aminoácido preferiblemente ácido gamma-carboxiglutámico. 5. Con el péptido SEQ ID No. 4 residuo 7 6. Con el péptido SEQ ID No. 4 y 5 en la longitud de la secuencia.		agonistas del receptor NMDA relacionadas con dolor en modelos <i>in-vitro</i> de cultivo primario de Ganglio dorsal. También en modelos <i>in-vivo</i> de Parkinson, epilepsia y la incontinencia urinaria.
US6277825B1 (17).	Secuencia 20: Asn Ile Ala Lys Gly Cys Lys Val Asn. Cys Tyr Pro	1. Sintetizado de la secuencia de <i>Conus radiatus</i> 2. Secuencia de 12 aminoácidos 3. En los residuos 3, 4, 7 y 8	No determinada	Un método para tratar trastornos en los que la fisiopatología implica una excitación excesiva de las células nerviosas por aminoácidos excitadores o agonistas del receptor NMDA relacionadas con dolor en modelos <i>in-vitro</i> de cultivo primario de Ganglio dorsal. También en modelos <i>in-vivo</i> de Parkinson, epilepsia y la incontinencia urinaria.
ES2207970T3 (18)	5 péptidos cíclicos de entre 19 a 25 aminoácidos	1. péptidos cíclicos de entre 19 a 25 aminoácidos. 2. Presentan algunos residuos de ácido gamma-carboxiglutámico	250	IC50 determinada en línea celular y aplicación en neuronas hipocampales.
US6399574B1	Secuencias 12 a 40	1. Péptidos de 4 a 8 residuos, generados	Rango	Péptidos con actividad

(19)		desde diferentes conantoquinas. 2. Presentan en 3 y 4 el residuo de ácido gamma-carboxiglutámico 3. Variación en la longitud de residuos que conforman la secuencia.	[0.045-0.088]	antagónica, ensayados en modelos <i>in-vivo</i> de ratón para controlar convulsiones, modelo <i>in-vivo</i> en ratones de Parkinson. IC50 determinado en neuronas de corteza.
US9782454B2 (20)	Secuencia ID 1346: His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr X1 Arg Leu X2 Lys Gln Leu X1 Val Lys X2 Tyr Leu Asn X1 Ile Leu Asn	4. Secuencia de 28 residuos. 1. X1 y X2 son residuos cíclicos modificados 2. Es la combinación de varias secuencias de origen natural entre ellas las conantoquinas	ND: No determinada	Este péptido puede servir en prevención de una pluralidad de enfermedades causadas por vías bioquímicas o biológicas disfuncionales relacionadas con la hipertensión.
CN102167729A	Secuencia Glu-Con-G: Gly Glu Glu Glu Leu Gln Glu Asn Gln Glu Leu Ile Arg Glu Lys Ser Asn	1. El análogo es un polipéptido que se obtiene sustituyendo los residuos de ácido gamma-carboxiglutámico (Gla) en los sitios 3, 4, 7, 10 y 14 por el residuo de glutamato (Glu) 2. Con el péptido SEQ ID No. 4 residuo 7 3. Con el péptido SEQ ID No. 5 residuo 8	No reporta	el polipéptido tiene un efecto de intervención sobre la dependencia psicológica y la dependencia física de la morfina; y en comparación con la morfina, el análogo tiene un efecto analgésico más fuerte. Modelos <i>in-vivo</i> de dolor en ratones.
AU2012328927B2	Secuencias 1-34: Secuencias de tetrapéptidos	1. Secuencias de tetra péptidos con 1 o 2 residuos de Prolina.	ND: No determinada	Se describen compuestos que tienen potencia mejorada en la modulación de NMDAR. Estudios <i>in-vivo</i> en ratones para

				reducir el dolor neuropático.
--	--	--	--	-------------------------------

Tabla 2

Condición de OGD	Porcentaje del Incremento en la viabilidad con SEQ ID NO: 2	Porcentaje del Incremento en la viabilidad con y SEQ ID NO: 3
Hipoxia	46	53
Hipoxia + reoxigenación	51	48
reoxigenación	4	49

Tabla 3

Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
Caspasa 3-Clivada (D175) Rabbit AB, Cell Signaling 1:500	Anti-rabbit 1:2000
Espectrina cadena Alpha MAB 1622 MERCK 1:1000	Anti-mouse 1:5000
NMDAR GluN1 (D65B7) Rabbit mAb #5704 1:200	Anti-Rabbit 1:2000
Actin- beta (8H10D10) ratón mAb #3700 Cell Signaling 1:15000	Anti-mouse 1:5000