



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

“Efecto activador del compuesto BL-1249 sobre el canal  
de K<sup>+</sup> Kv10.1”

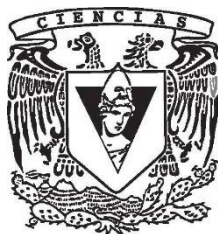
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Biólogo

P R E S E N T A:

Israel Armando Estrada Garrido



**DIRECTOR DE TESIS:**  
**DR. ENOCH LUIS BALTAZAR**

**Ciudad Universitaria, Cd. Mx., Junio 2021**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Canalopatías (LaNCa) en el Instituto de Fisiología Celular-UNAM en la Ciudad de México, México.



Financiado por CONACYT: CB-2017-2018/A1-S-13646

Beca CONACYT No. de registro 30029

### Hoja de datos del jurado

1.	Datos del alumno
Apellido paterno	Estrada
Apellido Materno	Garrido
Nombre(s)	Israel Armando
Teléfono	55 43 51 21 72
Universidad	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad	Facultad de Ciencias
Carrera	Biología
Número de cuenta	313218981
2.	Datos del tutor
Grado	Dr.
Nombre(s)	Enoch
Apellido paterno	Luis
Apellido materno	Baltazar
3.	Datos del sinodal 1
Grado	Dra.
Nombre(s)	Ruth
Apellido paterno	Rincón
Apellido materno	Heredia
4.	Datos del sinodal 2
Grado	Dr.
Nombre(s)	Pedro David
Apellido paterno	Segura
Apellido materno	Chama
5.	Datos del sinodal 3
Grado	Dra.
Nombre(s)	María Luisa
Apellido paterno	Durán
Apellido materno	Pastén
6.	Datos del sinodal 4
Grado	Dra.
Nombre(s)	Floria Josefina
Apellido paterno	Lizárraga
Apellido materno	Sánchez
7.	Datos del trabajo escrito
Título	Efecto activador del compuesto BL-1249 sobre el canal de K <sup>+</sup> Kv10.1
Número de páginas	59
Año	2021

## AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

---

Parte de este trabajo se realizó con el apoyo técnico de la Dra. Luisa Durán Pasten, agradezco sus valiosos comentarios en la realización de esta tesis.

---

Agradezco el apoyo técnico del Fís. César Oliver Lara Figueroa del LaNCa, agradezco su labor y su disposición al proporcionar los reactivos y materiales necesarios para la elaboración de esta tesis. Además, agradezco a Agustín Flores González por su apoyo brindado como auxiliar de laboratorio.

---

Agradezco a la Dra. Floria Josefina Lizárraga Sánchez, al Dr. Pedro David Segura Chama y la Dra. Ruth Rincón Heredia, quienes forman parte del comité revisor de esta tesis y que gracias a sus comentarios enriquecieron el escrito.

---

Agradezco a todo el personal de la Unidad de Computo del IFC por su ayuda para resolver problemas de carácter informático al momento de realizar esta tesis.

---

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

*En primer lugar, quiero dedicar y agradecer a mis padres Israel Estrada Rufino y María del Refugio Garrido de Anda por ser los principales promotores de mis sueños, gracias a ellos por cada día confiar y creer en mi y en mis expectativas, gracias por estar dispuestos a acompañarme cada larga y agotadora noche de estudio y por ser un sostén para mí en mis salidas de campo, gracias por cada consejo y por cada palabra que me han dicho para guiarme durante mi vida. Por la oportunidad que me ofrecieron, por el continuo apoyo que siempre he tenido de ustedes, por todo lo que me han enseñado desde entonces y lo que me queda por aprender de ustedes, en resumen, por todo lo que he vivido a su lado desde que entré en sus vidas, GRACIAS.*

*También quiero agradecer a mis hermanos Ramiro, Cristian y Julio por su paciencia y apoyo en todos estos años y a mi primo Jerónimo que al igual que yo estudio Biología y ha sido un gran apoyo para mi en la Facultad.*

*Por último y no menos importante quiero dar mi mayor agradecimiento al Dr. Enoch Luis Baltazar por el apoyo, el tiempo, consejos y por todo lo que he aprendido de él durante este tiempo en el laboratorio a pesar de la emergencia sanitaria que se vive en el mundo por el COVID-19, y a todos los compañeros del laboratorio Oswaldo, Esteban, Oliver y María Luisa y a cada amigo que tuve en la carrera.*

*A mi universidad, la UNAM*

# INDICE

<b>Resumen .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1 Los canales iónicos .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.1 Las canalopatías .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2 Canales iónicos de K<sup>+</sup> como blancos para el tratamiento de patologías ...</b>	<b>6</b>
<b>1.3 El canal de potasio dependiente de voltaje Kv10.1 .....</b>	<b>10</b>
<b>1.3.1 Expresión.....</b>	<b>11</b>
<b>1.3.2 Estructura .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3.3 Biofísica .....</b>	<b>13</b>
<b>1.4 El Kv10.1 como blanco farmacológico en el cáncer. ....</b>	<b>14</b>
<b>1.4.1 Farmacología: anticuerpos, inhibidores y activadores.....</b>	<b>16</b>
<b>1.5 Compuesto BL-1249.....</b>	<b>18</b>
<b>2. Justificación .....</b>	<b>20</b>
<b>3 Hipótesis .....</b>	<b>22</b>
<b>4. Objetivos .....</b>	<b>22</b>
<b>4.1 Objetivo general .....</b>	<b>22</b>
<b>4.2 Objetivo particulares.....</b>	<b>22</b>
<b>5. Materiales y métodos.....</b>	<b>23</b>
<b>5.1 Cultivos celulares.....</b>	<b>23</b>
<b>5.2 Electrofisiología .....</b>	<b>23</b>
<b>5.3 Compuesto BL-1249.....</b>	<b>26</b>
<b>5.4 Análisis estadístico .....</b>	<b>27</b>
<b>6. Resultados .....</b>	<b>28</b>
<b>6.1 Corrientes macroscópicas en las células HEK-Kv10.1 vs HEK-293 silvestre.....</b>	<b>28</b>
<b>6.2 El efecto del BL-1249 sobre las corrientes generadas por el canal Kv10.1 .....</b>	<b>30</b>

<b>6.3 Efecto del BL-1249 sobre las corrientes endógenas en las células HEK-WT.....</b>	<b>33</b>
<b>6.4 Efecto del BL-1249 sobre el potencial de membrana de las células HEK-Kv10.1.....</b>	<b>35</b>
<b>7. Discusión .....</b>	<b>38</b>
<b>7.1 El primer activador de Kv10.1 .....</b>	<b>39</b>
<b>7.2 El potencial de membrana en reposo, el cáncer y el Kv10.1 .....</b>	<b>40</b>
<b>7.3 Posible mecanismo de acción del BL-1249 sobre el Kv10.1 .....</b>	<b>42</b>
<b>7.4 Perspectivas de trabajo .....</b>	<b>43</b>
<b>8. Conclusiones.....</b>	<b>45</b>
<b>9. Bibliografía.....</b>	<b>46</b>



## Resumen

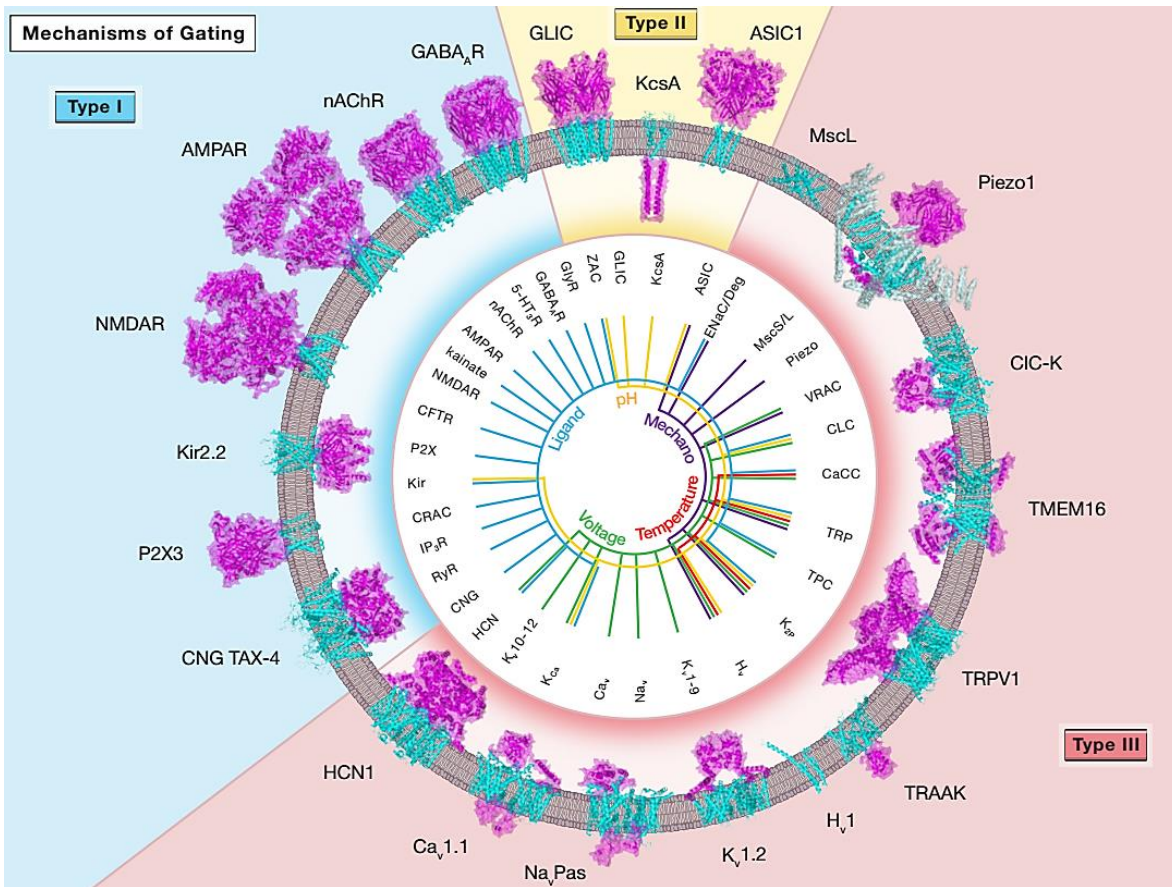
El canal de potasio Kv10.1, es un canal iónico que ha sido propuesto como un potencial blanco farmacológico para el tratamiento del cáncer, puesto que su sobreexpresión en células normales se ha asociado a una transformación hacia un fenotipo de célula tumoral. En la literatura, la inhibición farmacológica del canal ha mostrado resultados positivos al disminuir muchas propiedades malignas de las células cancerígenas, como la proliferación y la angiogénesis, sin embargo, la mayoría de los compuestos descritos hasta la fecha muestran poca especificidad, (ej. el astemizol, Imipramina y mibefradil). El hecho de que el canal Kv10.1 se encuentre sobreexpresado en diversos tipos de cáncer, ha aumentado el interés en la búsqueda de compuestos que disminuyan su actividad, dejando de lado la búsqueda de los compuestos con efecto activador y que igualmente puedan tener un impacto positivo. Debido a que el compuesto BL-1249 se ha reportado que facilita la apertura de otros subtipos de canales de K<sup>+</sup>, como TREK-1 y TREK-2, en esta tesis se aborda su posible acción sobre la actividad del canal Kv10.1. Este compuesto mostró tener un efecto activador (*opener*) sobre el canal Kv10.1; el cual fue dependiente de la concentración, lo que sugiere que dicho efecto resulta en la dependencia del voltaje del canal, desplazando su activación hacia valores de potencial de membrana más negativos. El BL-1249 es una herramienta farmacológica interesante para el estudio del canal Kv10.1, tanto para los estudios biofísicos del canal, como por su papel de éste en la biología del cáncer.

**Palabras clave: canal de K<sup>+</sup> Kv10.1; BL-1249; oncocanalopatías; oncocanal**

## 1. Introducción

### 1.1 Los canales iónicos

Los canales iónicos son proteínas integrales, que se localizan principalmente en la membrana plasmática de las células eucariotas, aunque también es posible localizarlas en la membrana de organelos intracelulares como las mitocondrias, el retículo endoplásmico, el núcleo, los lisosomas, el aparato de Golgi, los peroxisomas y los endosomas (Hille, 2001; Peruzzo *et al*, 2016). Estas proteínas, están embebidas en la bicapa lipídica que forma la membrana celular, donde crean poros acuosos semipermeables que conectan el espacio intracelular y el extracelular, permitiendo el movimiento de iones ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$ ) en favor de su gradiente electroquímico (Subramanyam & Colecraft, 2015). De forma general, los canales iónicos pueden tener dos estados conformacionales, el abierto y el cerrado. El abierto que es considerado un estado “conductor” que permite el movimiento de iones y el cerrado o “no conductor”. La transición del estado cerrado al abierto se denomina apertura (*gating*) del canal, y éste puede estar influenciado por una gran diversidad de estímulos. Es así que, en función del estímulo que los active tenemos canales activados por voltaje (Martin, 2004; Alberts *et al*, 2002, 2015; Carrizosa, 2006), por estímulos químicos (ligandos extracelulares o intracelulares) (Alberts *et al*, 2002, 2015; Martin, 2004; Carrizosa, 2006), por estímulos físicos (presión o temperatura) (Alberts *et al*, 2002, 2015; Martin, 2004; Carrizosa, 2006) y algunos más que son activados por múltiples estímulos (polimodales) (Figura 1) (Armijo Simón *et al*, 2000; Alberts *et al*, 2002, 2015; Martin, 2004; Carrizosa, 2006).



**Figura 1.** Esquema que muestra la gran diversidad de canales iónicos y los principales estímulos que los activan. La membrana celular está denotada de color gris, las regiones transmembranales de cada canal están representadas de color azul y las regiones intra- o extracelulares se observan en color rosa. Los canales iónicos de tipo I comprenden principalmente los canales activados por ligando y están señalados con un fondo de color azul. Los canales iónicos de tipo II comprenden los canales que son sensibles a los cambios de pH y están señalados con un fondo de color amarillo. Los canales iónicos tipo III son aquellos canales que cambian su conformación por estímulos físicos como voltaje, temperatura o estímulos mecánicos y están denotados con un fondo de color naranja claro. Tomado de Snapshot: Channel Gating Mechanisms, Cell 170 (2017), 594.e1.

Con toda certeza se puede afirmar que los canales iónicos se expresan en todas las células de los mamíferos, donde cumplen una variedad de funciones. Por ejemplo, en células excitables (neuronas, miocitos o células endocrinas) los canales iónicos son responsables de la generación de potenciales de acción, la contracción muscular, la liberación de neurotransmisores, y en algunos otros procesos como la apoptosis celular (Cahalan et al., 2001; Martin, 2004).

Para referirnos a todo el conjunto de canales iónicos expresados en un organismo, tejido o célula (incluidos estados patológicos) se utiliza el término canaloma (en inglés *channelome*), el cual es análogo a otros términos aceptados ampliamente como son el proteoma (que estudia las proteínas) o el conectoma (que estudia las conexiones que existen entre las neuronas); la rama de las ciencias que se encarga de caracterizar todos los canales iónicos (*channelome*) es denominada como la canalómica (en inglés “*channelomic*”).

### **1.1.1 Las canalopatías**

Debido a la amplia distribución de canales iónicos en células y tejidos, aunado a sus muy variadas estructuras y funciones, no es raro que el funcionamiento anómalo de estas proteínas esté relacionado con varias afecciones, las cuales se engloban dentro del término de canalopatías (Cruz *et al*, 2017).

Con el avance de las técnicas de biología molecular, en especial con las que han permitido la clonación de los genes que codifican para canales iónicos y los análisis genéticos de enfermedades hereditarias, se volvió evidente que muchas de estas enfermedades eran producto de mutaciones en los genes que codifican para estas proteínas. Al principio de 1990 se encontró que algunas enfermedades hereditarias, como la miotonía congénita, eran debidas a mutaciones en canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje (que afectaban la biofísica del canal), lo que dio origen al término canalopatías de sodio. Sin embargo, con el paso del tiempo el repertorio de canalopatías no se restringió a canales de Na<sup>+</sup> únicamente (Carrizosa, 2006), en la actualidad se contempla que todos los genes que codifican para canales iónicos pueden verse afectados, desencadenando múltiples enfermedades en diversos

órganos y sistemas del organismo (p. ej. arritmias cardíacas, epilepsias, diversos síndromes sensoriales) (Sánchez Dr., 2012; Martin, 2004; Carrizosa, 2006).

En un inicio, las canalopatías eran exclusivamente las que resultaban de una mutación en los genes que codificaban para canales iónicos y que por consiguiente producían cambios en las propiedades biofísicas de éstos; sin embargo, actualmente también se incluyen estados patológicos que resultan de: la expresión anormal de canales iónicos funcionales, consecuencia de enfermedades autoinmunes, los problemas con la síntesis de canales iónicos, aquellos por modificaciones postraduccionales y por problemas en el tráfico de canales y subunidades accesorias hacia la membrana (Kim, 2014; Pérez *et al*, 2017). En la actualidad, el número de canalopatías cubre un amplio espectro, y las hay tan raras como el síndrome de Bartter (con una prevalencia de 1/1 000 000) o tan comunes como fibrosis quística (con una prevalencia de 1/3000) (Kass, 2005; Prevarskaya *et al.*, 2018).

Al principio de 1980 se realizaron los primeros reportes acerca de la expresión anormal de canales iónicos en células cancerígenas, a su vez, se observó que el bloqueo farmacológico de estos canales disminuía la tasa de proliferación de estas células tumorales. Estos hallazgos permitían colocar al cáncer dentro de la definición de canalopatías. Sin embargo, el cáncer no puede ser considerado una canalopatía debido a su complejidad. No obstante, existen datos que corroboran una relación causal entre la expresión anómala de canales iónicos y su papel en alguno o varios de los procesos característicos de la carcinogénesis, como una tasa alta de proliferación, resistencia a la apoptosis, estimulación de angiogénesis,

migración e invasividad (Peruzzo et al., 2016; Wickenden et al., 2012). Desde un punto de vista genocentrista, el cáncer es un conjunto de enfermedades en las cuales existen mutaciones en los genes que controlan el cómo las células crecen, se dividen y mueren (principalmente los oncogenes y los genes supresores de tumores), lo cual al final se refleja en una inestabilidad genómica y un fenotipo de célula tumoral; en toda esta transformación es inevitable que los genes que codifican a canales iónicos se vean afectados. La alteración de la expresión de canales iónicos en células cancerígenas hizo que se acuñara el término de “oncocanalopatías” y a todos aquellos canales que favorecen la transformación maligna o algunas características que definen a una célula tumoral se les denomina oncocanales o canales oncogénicos (Prevarskaya et al., 2018).

## **1.2 Canales iónicos de K<sup>+</sup> como blancos para el tratamiento de patologías**

Dentro de todos los canales iónicos, la familia de canales permeables a K<sup>+</sup> forman la familia con mayor diversidad estructural y funcional. En humanos, se expresan alrededor de 80 subtipos diferentes de canales de K<sup>+</sup>, en comparación con aproximadamente los 10 de Na<sup>+</sup> y 10 de Ca<sup>2+</sup>; por lo que esta gran diversidad podría sugiere una importancia fisiológica (Figura 2A) (Hille, 2001; Pardo & Stühmer, 2014; Wulff et al., 2009). Esta familia se ha subdividido con base en sus características estructurales (número de segmentos transmembranales) y modos de activación en 4 subfamilias (Figura 2B):

1. Canales rectificantes de entrada con 2 segmentos transmembranales por subunidad (Kir),

2. Canales con 2 regiones formadoras de poro y 4 segmentos transmembranales por subunidad (K<sub>2</sub>P),
3. Canales activados por calcio intracelular y con 6 segmentos transmembranales por subunidad (K<sub>Ca</sub>),
4. Canales activados por voltaje y con 6 segmentos transmembranales por subunidad (K<sub>v</sub>).

En humanos, los canales K<sub>v</sub> son codificados por 40 genes y divididos en 12 subfamilias (K<sub>v</sub>1-12). Un canal funcional está formado por el ensamble de 4 subunidades idénticas, cada subunidad tiene una estructura similar la cual consiste en 6 segmentos transmembrana (S1-S6) y un asa P que se localiza cerca del poro de conducción. El poro del canal se forma por el alineamiento de los segmentos S5, S6 y el asa P de las cuatro subunidades proteicas. Los segmentos S1-S4, actúan como un dominio sensor de voltaje. Los 40 canales K<sub>v</sub> han sido clonados y sus propiedades biofísicas han sido caracterizadas (Figura 2C) (Wulff et al., 2009).

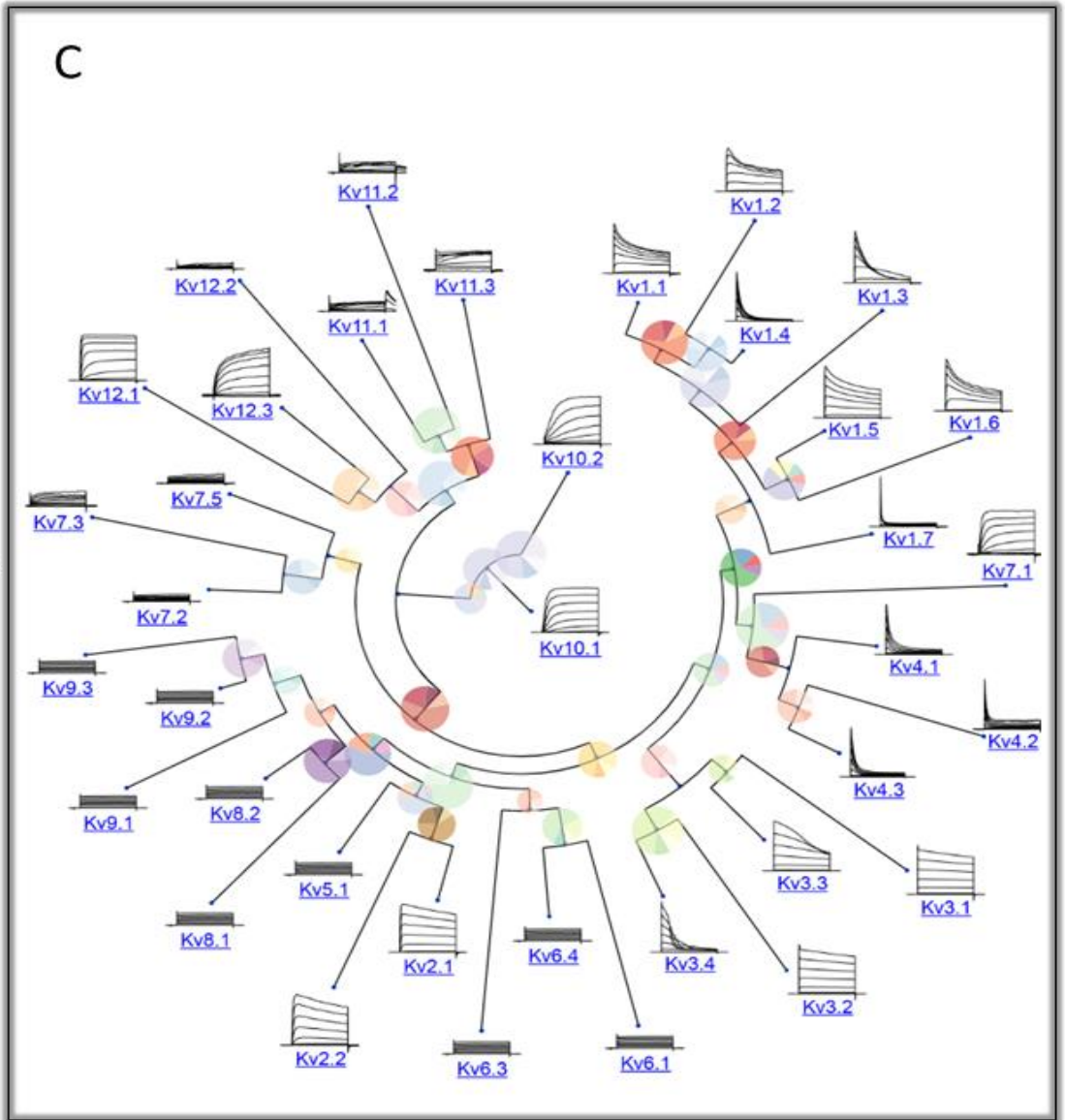
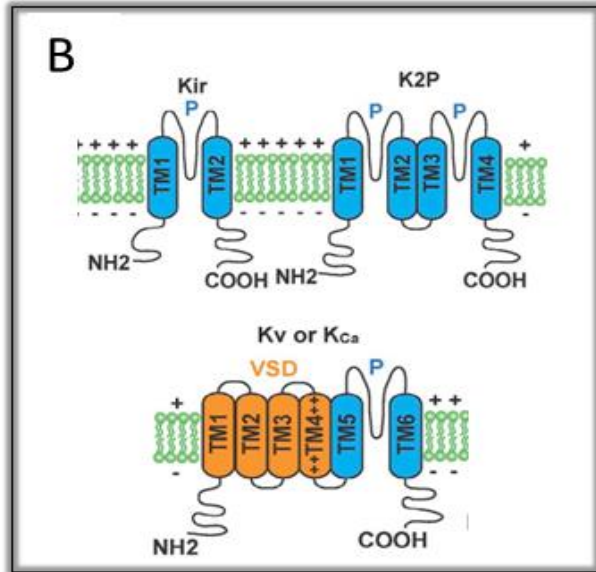
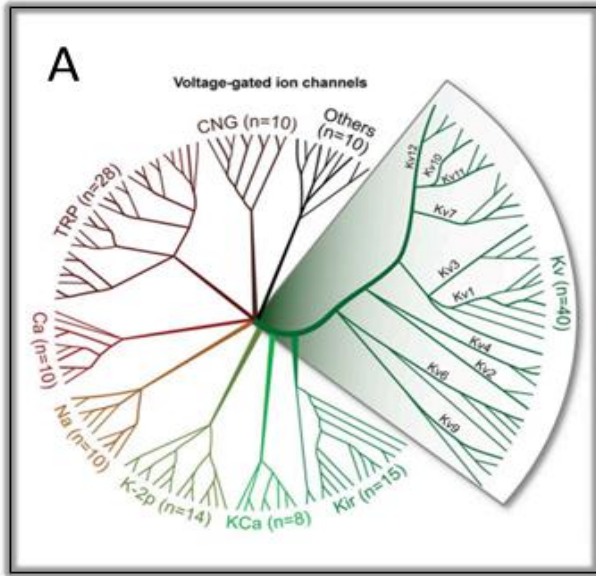
En condiciones fisiológicas y debido al gradiente de concentración de K<sup>+</sup>, la apertura de canales de K<sub>v</sub> resulta en la salida de este ion de las células, con la pérdida de cargas positivas el potencial de membrana de la célula tiende a hacerse más negativo (hiperpolarizado). En células excitable, la apertura farmacológica de los K<sub>v</sub> reduciría la excitabilidad de las células (es decir, sería más complicado que respondieran a estímulos), mientras que su inhibición farmacológica tendría el efecto opuesto e incrementaría la excitabilidad celular. En neuronas y miocitos, la apertura de K<sub>v</sub> es responsable de la fase de repolarización del potencial de acción. Además de su participación en el potencial de acción, los canales de K<sup>+</sup> también

juegan un papel importante en otros procesos celulares como la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, la regulación del volumen celular, así como en la secreción, proliferación y migración celular. Debido a esto, estos canales se han considerado como un blanco potencial para el tratamiento de enfermedades que se relacionan con alguno de estos procesos, como son el cáncer, enfermedades autoinmunes y metabólicas, y por supuesto enfermedades neurológicas y cardíacas (Bagal et al., 2013; Wulff et al., 2009).

Los agentes químicos que pueden modular canales Kv se dividen básicamente en tres grupos: **1)** iones metálicos, **2)** moléculas pequeñas (con peso molecular entre 200-500 Da) y **3)** péptidos provenientes del veneno de animales ponzoñosos (con pesos moleculares entre 3-6 kDa) (Ma et al, 2018; Moreels et al, 2017, 2016; Ramírez-Carretero et al, 2019). Estos compuestos pueden modular la actividad de los Kv a través del bloqueo del poro de conducción del canal (ya sea desde el lado externo o interno), o bien modificando la apertura del canal a través de la unión al dominio sensor del voltaje. Otra alternativa farmacológica consiste en el uso de anticuerpos, los cuales se ha demostrado que pueden inhibir la actividad de los canales (Hernandez-Resendiz et al., 2019). El trabajo referente al uso de activadores (*openers*) de canales de  $\text{K}^+$ , así como su mecanismo de acción es escaso.

En años recientes, el canal de potasio Kv10.1 ha recibido una visibilidad notable debido a que se ha observado una sobreexpresión de éste en alrededor del 70% de los tumores sólidos, en contraparte con su baja expresión en tejidos sanos. Esto ha priorizado la búsqueda de compuestos que modulen la actividad del Kv10.1.





**Figura 2. Canales de K<sup>+</sup>.** A) Árbol filogenético donde se observa los 145 canales iónicos activados por voltaje, resaltando en grande los 40 canales de potasio activados por voltaje, divididos en 12 subfamilias; tomado de (Ranjan et al., 2019). B) Esquema que muestra la diversidad estructural de las subunidades que conforman a los canales de K<sup>+</sup> (Kir, K2P, Kca y Kv). C) Familia de corrientes iónicas generadas por cada miembro de los canales Kv; imagen tomada de <https://channelpedia.epfl.ch/>.

### 1.3 El canal de potasio dependiente de voltaje Kv10.1

El canal de potasio dependiente de voltaje Kv10.1 o canal *ether-à-go-go-1* (Eag1), es el miembro fundador de la subfamilia de canales de K<sup>+</sup> KCNH (por la familia de genes que los codifican). Esta subfamilia juega un papel muy importante en la repolarización cardíaca, en la proliferación celular, en la excitabilidad neuronal y en el crecimiento de tumores (Wang *et al*, 2017). Hasta la fecha, han sido descritos 8 miembros de esta subfamilia, los cuales se clasifican con base en su homología estructural en tres subtipos: **1)** EAG formados por los canales Kv10.1 y Kv10.2, **2)** ERG (*eag-related gene*) formado por los canales Kv11.1, Kv11.2 y Kv11.3, y **3)** ELK (*eag-like K<sup>+</sup> channel*) formado por los canales Kv12.1, Kv12.2 y Kv12.3 (Gutman et al., 2005). Una característica común de esta subfamilia, y que los hace diferentes a otros Kv, es que los extremos amino (N-) y carboxilo (C-) terminal son muy grandes (aproximadamente el 50% de cada subunidad proteica, con el N- terminal comprendiendo desde los aminoácidos 1 al 220 y la C-terminal de la posición 499 a la 989 respectivamente) y contienen muchos dominios o sitios de modulación (Barros et al., 2020; Bauer & Schwarz, 2018).

### **1.3.1 Expresión**

En personas sanas, el canal Kv10.1 es una proteína que se expresa principalmente en estructuras del sistema nervioso central: en el bulbo olfatorio, corteza cerebral, hipocampo, hipotálamo y cerebelo (Martin et al., 2008). Además, el canal también se localiza en las fibras paralelas del cerebelo, donde regula el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  y la liberación de neurotransmisores (Mortensen et al., 2015). A nivel de mRNA, el canal también ha sido encontrado en: placenta, testículos y glándulas suprarrenales.

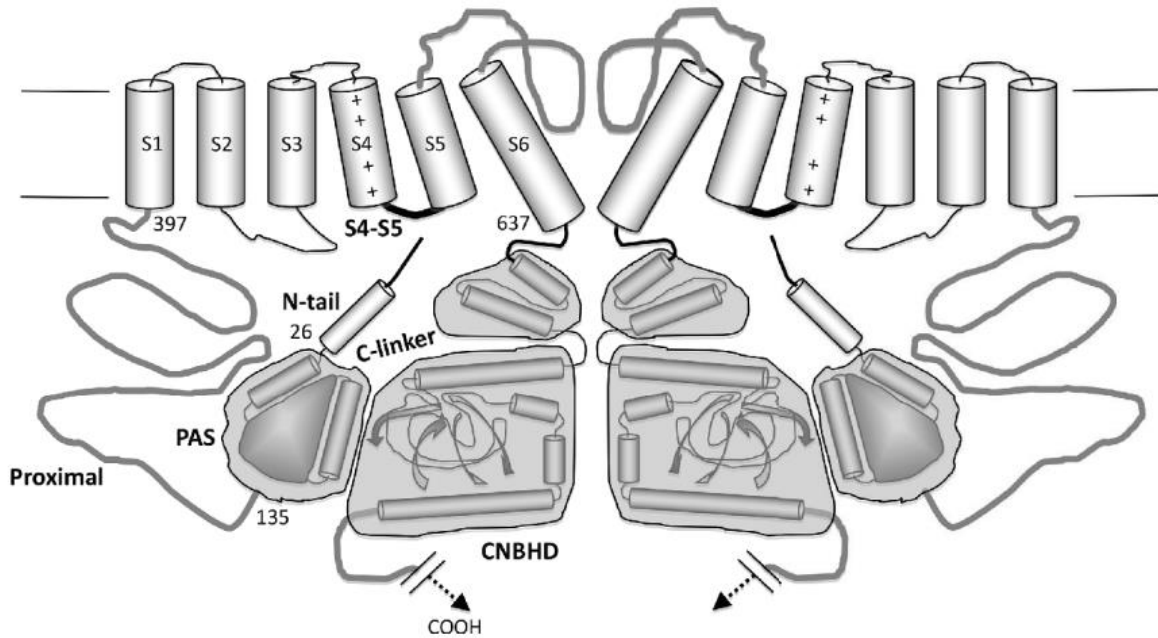
La expresión del canal Kv10.1 está regulada por varias moléculas, entre las cuales se encuentran p53 y Rb (genes supresores tumorales), E2F1, que es un factor de transcripción y por el micro-RNA miR34a (Pardo & Stühmer, 2014).

Los factores p53 y Rb regulan negativamente la expresión del Kv10.1 al promover la inhibición de la expresión del Kv10.1 mediada por el factor de transcripción E2F1 (Stühmer, 2017). La expresión del Kv10.1 es diferencial a través del ciclo celular y su expresión correcta permite el progreso del ciclo celular (su alta expresión es en entre las fases G2 y M del ciclo celular), mientras que su inhibición lo detiene (Sánchez *et al*, 2016; Urrego *et al*, 2014). Además, el canal iónico también se expresa de manera anormal en el 70% de los tumores benignos y malignos con diferentes orígenes, donde ha sido usado como biomarcador en estadios tempranos de cáncer (colon, cervical, glioma, sarcoma, próstata y en leucemia mieloide aguda) (Camacho, 2006; Rodríguez-Rasgado et al., 2012).

### **1.3.2 Estructura**

En humanos, el canal Kv10.1 es una proteína de 962 aminoácidos que es codificada por el gen KCNH1, localizado en el cromosoma 1q32.1–32.3 (Kuang et al., 2015;

Occhiodoro et al., 1998). Esta proteína transmembranal posee una organización estructural similar a los otros canales de potasio dependientes de voltaje. El canal funcional dispone de un ensamblaje homotetramérico, es decir, posee cuatro subunidades idénticas, cada subunidad contiene 6 segmentos transmembranales, donde los primeros cuatro segmentos (S1-S4) constituyen el dominio sensor de voltaje, y los últimos dos segmentos (S5 y S6) forman el poro selectivo a potasio, con los extremos N- y C- terminal en el interior de la célula (Barros et al., 2020; Whicher & MacKinnon, 2016). Además, posee tres dominios intracelulares: en la región N- terminal posee una región conservada en todos los miembros de la subfamilia KCNH, por lo que se denomina dominio *eag*, el cual se encuentra muy cerca de otra región denominada PAS (Per-ARNT-Sim), por lo que estas regiones son llamadas en su conjunto dominio *eag/PAS* (Barros et al., 2020), en el extremo C- terminal se encuentran un dominio *C-enlazador* y un dominio homólogo de unión a nucleótidos cíclicos (CNBHD) (Figura 3) (Barros et al., 2020; Whicher & MacKinnon, 2016).



**Figura 3.** Representación esquemática de dos subunidades de canales Kv11.1, homólogas a las subunidades Kv10.1. Aquí se muestran los dominios característicos de esta subfamilia. Los segmentos transmembrana están nombrados como S1 a S6, con el asa P entre el S5 y S6. En la región intracelular, se puede observar que el extremo N-terminal posee el dominio PAS, mientras que la región C-terminal tiene los dominios de C-linker y dominio homólogo de unión a nucleótidos cíclicos (CNBHD). Tomado de (Barros *et al.*, 2020)

### 1.3.3 Biofísica

Los estudios electrofisiológicos muestran que el canal Kv10.1 es activado por la despolarización del potencial de membrana en reposo de las células, y que las corrientes generadas por la apertura del canal son del tipo rectificantes de salida, es decir, cuando se obtienen la familia de curvas corriente vs voltaje se aprecia una mayor amplitud de corriente a voltajes positivos que a voltajes negativos. La activación del canal Kv10.1 genera corrientes iónicas con una cinética de activación relativamente lenta y que no muestran inactivación. La característica más notable de las corrientes Kv10.1, son que la cinética de activación depende altamente del potencial de membrana; cuando el potencial de membrana es fijado en valores muy

negativos, la activación de Kv10.1 es más lenta que cuando el potencial de membrana es fijado en valores más positivos, un fenómeno conocido como el movimiento Cole-Moore. La activación más lenta asociada con un potencial de membrana más negativo se puede modelar asumiendo que los canales deben transitar a través de más estados cerrados hasta llegar al estado abierto (Wang *et al*, 2017). El fenómeno producido por el potencial de membrana más negativo también puede ser potenciado por la concentración extracelular de cationes divalentes, como el Mg<sup>2+</sup>.

A nivel de canal único, la conductancia unitaria del canal varía entre 4.9 a 7.4 pS, con un potencial medio de activación ( $V_{1/2}$ ) de aproximadamente +8 mV (Wang *et al*, 2017; Whicher & MacKinnon, 2016).

#### **1.4 El Kv10.1 como blanco farmacológico en el cáncer.**

Una peculiaridad del canal Kv10.1, es su alta expresión en líneas celulares cancerígenas, así como en tejido proveniente de biopsias de tumores. Se ha reportado una relación causal entre la sobreexpresión ectópica del canal Kv10.1 con la carcinogénesis, pues se sobreexpresa en alrededor del 70% de los tumores sólidos (Camacho, 2006; Hemmerlein *et al.*, 2006). El potencial oncogénico del canal ha sido hipotetizado con base en experimentos farmacológicos, en donde el uso de bloqueadores y de anticuerpos monoclonales contra este canal ha mostrado una reducción en la tasa de proliferación de varias líneas celulares tumorales (García-Ferreiro *et al*, 2004; Gómez-Varela *et al*, 2007). La primera evidencia experimental del potencial oncogénico del canal Kv10.1 fue realizado por Luis Pardo en 1999, demostrando que la simple expresión del canal Kv10.1 alteraba el fenotipo

de células epiteliales de mamífero, haciendo que éstas incrementaran su tasa de proliferación y metabolismo, al mismo tiempo que, en placas de cultivo éstas perdían la capacidad de detener su crecimiento por contacto. Adicionalmente, cuando las células que expresaban el canal Kv10.1 eran trasplantadas en ratas inmunosuprimidas, éstas desarrollaban tumores sólidos en cuestión de semanas (Pardo et al., 1999). El aumento de la expresión del canal en células tumorales hace que el Kv10.1 sea una proteína importante en la investigación de la biología del cáncer. De hecho, muchos estudios sobre el canal de K<sup>+</sup> Kv10.1 y el cáncer lo han propuesto como un marcador tumoral o bien como un objetivo terapéutico en varios tipos de cáncer (Oquadid-Ahidouch et al., 2016), destacando el interés biomédico en los mecanismos moleculares que regulan su sobreexpresión, los cuales son desconocidos hasta la fecha.

Cabe mencionar que el canal Kv10.1 regula las vías de señalización intracelular que promueven la proliferación celular y la tumorigénesis mediante mecanismos independientes al flujo de iones del potasio (Downie et al., 2008; Hegle et al., 2006). Teniendo la premisa anterior, el canal Kv10.1 se ha asociado con la activación de la vía de MAPK p38, activa con frecuencia en los diversos tumores, lo que resulta en un aumento de la proliferación celular (Hegle *et al*, 2006; Jin & Gereau IV, 2006; Issbrücker *et al*, 2003; Herlaar & Brown, 1999; Ono & Han, 2000).

Además, se ha detectado el Kv10.1 en la membrana nuclear interna, indicando un papel en la homeostasis del potasio nuclear o una interacción indirecta con la heterocromatina, que puede afectar la expresión génica (Chen et al., 2011). Por lo

tanto, es importante identificar los factores celulares que promueven y controlan la expresión del canal Kv10.1 en la biología tumoral.

El papel que desempeña el canal Kv10.1 en la fisiología celular es más complejo que únicamente su actividad como canal, debido a que, como se mencionaba anteriormente, su expresión impacta directa e indirectamente en diversas vías de señalización celular, probablemente a través de una amplia red de interacción proteína-proteína. Por ello, conocer los factores celulares que promueven y controlan la expresión del canal Kv10.1, podría contribuir al desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos específicamente contra el cáncer, aunado esto a su sobreexpresión en tejido tumoral (Cázares-Ordoñez & Pardo, 2017).

#### **1.4.1 Farmacología: anticuerpos, inhibidores y activadores**

La sobreexpresión del canal Kv10.1 en células cancerígenas ha promovido la búsqueda de compuestos que sean capaces de modular la actividad del canal y en última instancia reducir muchas propiedades características de células tumorales. Muchos de los compuestos encontrados son moléculas pequeñas que tienen la peculiaridad de ser poco específicas, no obstante, son compuestos que han servido para conocer muchas de las propiedades biofísicas del canal. Entre las moléculas pequeñas que inhiben al canal Kv10.1 están el astemizol (García-Quiroz & Camacho, 2011), la imipramina (Gavrilova-Ruch et al., 2002), el mibefradil (Gómez-Lagunas et al., 2017), la terfenadina (Pardo & Stühmer, 2014) y la dofetilida (Gómez-Varela et al., 2006). La molécula pequeña con relativa especificidad es el astemizol, el cual originalmente fue usado como un anti-histaminérgico y posteriormente como



un bloqueador del canal Kv10.1; esta molécula es capaz de atravesar la membrana celular y bloquear al canal desde el lado intracelular, obteniendo una IC<sub>50</sub> de alrededor de 200 nM (García-Ferreiro et al., 2004). Otra estrategia farmacológica ha sido el uso de anticuerpos monoclonales contra canales iónicos, los cuales reconocen regiones extracelulares del mismo; en este sentido, el anticuerpo monoclonal contra el canal Kv10.1, mAb56, mostró inhibir al canal de forma bastante potente, con una IC<sub>50</sub> de 300 nM, el cual a diferencia de las moléculas pequeñas, este anticuerpo no tiene efecto sobre otros canales de K<sup>+</sup>, como pueden ser el Kv10.2 y Kv11.1, los cuales tienen una estructura muy parecida al canal Kv10.1 (Gómez-Varela et al., 2007).

Por otro lado, la búsqueda de compuestos selectivos para el canal Kv10.1 ha llevado al uso de fracciones peptídicas aisladas del veneno de escorpiones, tarántulas y anemonas, siendo cuatro las descritas hasta el momento, sin embargo, es importante mencionar que la potencia de estos compuestos es baja en comparación con otros péptidos provenientes de toxinas y que tienen como blanco un canal iónico (Ma et al., 2018; Moreels et al., 2016, 2017; Ramírez-Carretero et al., 2019).

En farmacología, el uso de activadores (*openers*) o antagonistas (bloqueadores) de canales iónicos dependientes de voltaje son una herramienta muy importante para ensayar el papel funcional de diversos canales iónicos en células y tejidos específicos. A partir de los efectos que pueden tener agonistas o antagonistas sobre canales iónicos se puede determinar si éstos son potenciales blancos farmacológicos para determinadas patologías. Por lo cual, una alternativa a los compuestos que inhiben al canal Kv10.1 (moléculas pequeñas, anticuerpos o

fracciones peptídicas) es el uso de activadores (*openers*) del canal Kv10.1, los cuales podrían tener un impacto igual de positivo sobre diferentes características de células cancerígenas. Hasta la fecha no existe en la literatura ningún compuesto descrito con propiedad activadora del Kv10.1, por lo cual en esta tesis nos enfocamos en estudiar el compuesto BL-1249 sobre la actividad del canal Kv10.1 debido a que éste se ha descrito como un activador en otros canales de K<sup>+</sup>.

### **1.5 Compuesto BL-1249**

El BL-1249 es un compuesto sintético con carga negativa, además de ser un medicamento antiinflamatorio no esteroideo (AINE) que se ha descrito como un potente activador de los canales de K<sup>+</sup> de fuga K2P2.1 (TREK-1) y K2P10.1 (TREK-2); sin embargo, su mecanismo de acción y sus efectos en otros canales K2P o de K<sup>+</sup> no se han definidos (Tertyshnikova *et al.*, 2005).

Además, el BL-1249 se ha utilizado anteriormente como un compuesto capaz de producir una hiperpolarización en la membrana de miocitos de vejiga de rata a través de la activación de canales de potasio provocando una disminución de la actividad de los canales de calcio dependientes de voltaje y por consecuencia una disminución del calcio intracelular, que da como resultado la relajación en este músculo liso (la vejiga). Aunque no se conoce con certeza qué canal(es) de potasio esta(n) siendo afectado(s), debido a las propiedades en su expresión, su propiedades electrofisiológicas y farmacológicas se hipotetiza que se trata del canal TREK1 (Tertyshnikova *et al.*, 2005).

Por otro lado, se ha reportado que BL-1249 también induce relajación en tejido de íleon y colón, además de reducir la amplitud de contracciones espontáneas de estos

tejidos, cabe señalar que los tejidos antes mencionados expresan solamente el canal de potasio TREK-1, pero no TREK-2 ni TRAAK (Ma et al., 2018).

## 2. Justificación

Los tratamientos como la quimioterapia y la radiación empleados para pacientes con cáncer resultan agresivos, tienen efectos secundarios y disminuyen la calidad de vida de los pacientes; por consiguiente, en los últimos años se han buscado nuevas dianas farmacológicas para su tratamiento. Una idea extendida es que la identificación de nuevas dianas farmacológicas impactará de forma positiva en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra diversos tipos de tumores. En los últimos años, el canal Kv10.1 ha sido propuesto como potencial blanco farmacológico para el tratamiento del cáncer debido a que: **1)** se sobreexpresa en muchos tumores, **2)** se expresa de forma funcional en la membrana plasmática de células tumorales, lo que facilitan el diseño de drogas y lo hace un blanco accesible desde el espacio extracelular y **3)** ya existen compuestos en la clínica que actúan sobre canales iónicos, los cuales se usan para tratar diferentes condiciones fisiopatológicas, incluyendo enfermedades cardíacas y neurológicas (Bagal et al., 2013; Clare, 2010; Huang & Jan, 2014).

Desde su descubrimiento como promotor de la carcinogénesis, las herramientas farmacológicas contra el canal Kv10.1 han crecido exponencialmente. Sin embargo, todos los abordajes farmacológicos se han centrado en buscar reducir la expresión o la actividad del canal, omitiendo la búsqueda y uso de moléculas o compuestos que faciliten la actividad del canal. Dichas moléculas o compuestos pueden ayudar a entender mejor la biofísica del canal Kv10.1 y su participación en la biología del cáncer, además de que pueden tener efectos igual de positivos que el uso de inhibidores sobre la biología del cáncer. En consecuencia, en este trabajo se

estudiará el compuesto BL-1249 y sus efectos en células HEK-Kv10.1 y HEK-WT, debido a que activa potentemente otros canales de potasio, como el K2P2.1 (TREK-1) y K2P10.1 (TREK-2); sin embargo, su mecanismo de acción y sus efectos en otros canales de potasio no están bien definidos.

Cabe mencionar que el potencial de membrana en reposo de la mayoría de las células tumorales se encuentra más despolarizado en comparación con sus contrapartes sanas y también con respecto a células que proliferan poco o nada (p. ej. neuronas), lo que ha llevado a hipotetizar que potenciales de membrana despolarizados favorece la progresión maligna de células tumorales. Así, la búsqueda de un activador (*opener*) para el canal de K<sup>+</sup> Kv10.1 puede llevar a la hiperpolarización del potencial de membrana en reposo de las células con una alta expresión de este canal, y posiblemente frenar muchas de las características que le confieren su malignidad a estas células.

### **3 Hipótesis**

El activador de canales de K<sup>+</sup> K2P, BL-1249, facilitará la activación o apertura del canal de K<sup>+</sup> Kv10.1 y como resultado se promoverá la hiperpolarización del potencial de membrana en reposo de las células que expresen dicho canal iónico.

### **4. Objetivos**

#### **4.1 Objetivo general**

Estudiar mediante ensayos electrofisiológicos el efecto del compuesto BL-1249 sobre la amplitud de las corrientes mediadas por la activación del canal de K<sup>+</sup>, Kv10.1 y sobre el potencial de membrana en reposo de células que expresen el canal Kv10.1.

#### **4.2 Objetivo particulares**

1. Ensayar mediante experimentos de *patch-clamp* en la modalidad de célula completa, el efecto del compuesto BL-1249 sobre la amplitud de las corrientes iónicas generadas en la línea celular HEK-Kv10.1 y en células HEK293 silvestres.
2. Construir la curva dosis respuesta del compuesto BL-1249 sobre las corrientes Kv10.1.
3. Determinar si el BL-1249 modifica el  $V_{1/2}$  de activación del canal Kv10.1.
4. Ensayar si la aplicación de BL-1249 modifica el potencial de membrana en reposo de las células HEK-Kv10.1.

## **5. Materiales y métodos**

### **5.1 Cultivos celulares**

Para la realización de este trabajo se utilizó la línea celular HEK293 (*Human Embryonic Kidney*, por sus siglas en inglés) las cuales expresan de forma estable el canal iónico de potasio Kv10.1 (HEK-Kv10.1) de humano (donadas gentilmente al LaNCa por el Dr. Walter Stühmer, del Instituto Max-Planck de Alemania) y células HEK293 silvestres (HEK-WT) que no expresan de forma nativa el canal Kv10.1; ambos tipos celulares se sembraron en placas de cultivo (Corning® Costar CL33524-100EA) de 24 pozos (3.8 cm<sup>2</sup>) a diferentes concentraciones. Las células HEK-Kv10.1 se mantuvieron en medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, 12800-017, Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (26140087, Gibco), 1% de penicilina/estreptomicina (15140122, Gibco) y con el antibiótico de selección zeocina (R25001, Invitrogen) (30 µg/ml); las células HEK-WT se mantuvieron en DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de penicilina/estreptomicina. Las células se incubaron a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Pasadas 18 a 24 horas después de sembradas, las células fueron tripsinizadas y depositadas en cristales circulares (12 mm de diámetro) durante 2 horas para su adhesión al cristal. Posteriormente los cristales con las células se colocaron en la cámara de registro para comenzar los registros electrofisiológicos.

### **5.2 Electrofisiología**

Las corrientes iónicas generadas por las células HEK-Kv10.1 fueron estudiadas mediante la técnica de *patch-clamp* en el modo de fijación de voltaje y fijación de corriente en la configuración de célula completa. Los experimentos se realizaron a

temperatura ambiente (22-25 °C) y las células fueron bañadas constantemente con solución extracelular estándar (ver tabla 1) mediante un sistema de perfusión por gravedad (2 ml/min).

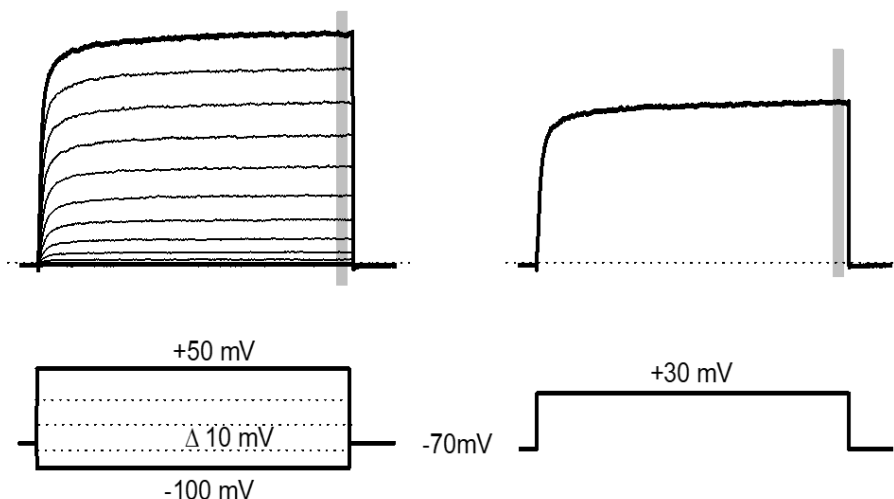
En los experimentos de fijación de voltaje se utilizaron dos tipos de protocolos de estimulación: **1)** para construir las gráficas de corriente contra voltaje (IV), el potencial de mantenimiento ( $V_h$ ) de la célula se fijó a -70 mV, desde este voltaje las corrientes fueron activadas con pulsos rectangulares de voltaje de -100 a +50 mV en pasos de 10 mV, los cuales tenían 250 ms de duración; y **2)** para obtener el curso temporal del efecto del fármaco, así como para realizar el análisis estadístico se utilizó un pulso fijo a +30 mV aplicado cada 5 segundos con una duración de 250 ms, el cual iniciaba de un  $V_h$  de -70 mV. En ambos protocolos la corriente fue cuantificada en la parte final del pulso de voltaje y graficada en función del voltaje o el tiempo, según fuera el caso (Figura 4).

Para los experimentos de fijación de corriente, se utilizó la configuración de *gap free*, y se registró el potencial de membrana en reposo libre de cada célula. El protocolo de registro consistió en 1 minuto de registro control, 1 minuto de registro en presencia del compuesto BL-1249 y después de esto el lavado.

Las corrientes se registraron con un amplificador Multiclamp 700B (Molecular Devices), a una velocidad de muestreo de 10 kHz. Los datos se digitalizaron usando el conversor analógico-digital Axon Digidata 1550 (Molecular Devices). El control de los estímulos y la adquisición de los datos se realizó con el programa pClamp 10 (Molecular Devices). En estos experimentos se usaron pipetas con una resistencia de 3-5 M $\Omega$  fabricadas con capilares de vidrio de borosilicato (Kwik-Fil, WPI, USA).



Cada pipeta se llenó con solución intracelular (ver tabla 1). Para los registros electrofisiológicos se seleccionaron las células con resistencia de acceso <10 MΩ.



**Figura 4. Protocolos de estimulación.** A la izquierda y abajo el protocolo usado para obtener las curvas IV; arriba a la izquierda ejemplo de corrientes  $K_v10.1$ , en sombreado las regiones usadas para cuantificar la amplitud de la corriente. A la derecha y abajo el protocolo de pulso fijo usado.

Con los valores de las gráficas IV se obtuvieron los valores de conductancia de la forma:  $G_K = I / (V_m - E_K)$ , donde I es la corriente,  $V_m$  el potencial de membrana y  $E_K$  el potencial de equilibrio del  $K^+$ . Los valores de conductancia fueron normalizados de la forma  $G/G_{max}$  y ajustados a una ecuación de Boltzmann de la forma:

$$G/G_{max} = \frac{1}{1 + \exp\left[-\frac{z(V - V_{1/2})}{kT}\right]}$$

en donde, z es la valencia,  $V_{1/2}$  es el voltaje medio de activación, k es la constante de Boltzmann y T es la temperatura.

Para la construcción de las gráficas dosis efecto, el efecto del BL-1249 fue normalizado de la siguiente forma  $R_{norm} = (R - R_{min}) / (R_{max} - R_{min})$ , en donde R es la respuesta promedio obtenida a cada concentración del compuesto,  $R_{min}$  es la respuesta control (sin compuesto),  $R_{max}$  es la respuesta promedio máxima obtenida

con 100  $\mu$ M de BL-1249. Posteriormente, los valores normalizados se graficaron y la curva dosis-efecto fue ajustada con una ecuación de Hill usando el método de Levenberg–Marquardt incorporado en el software Origin 2016 (OriginLab Corporation):

$$Potenciación = Bmax \frac{c^n}{EC50^n + c^n}$$

en donde, *Bmax* es la potenciación máxima, *EC<sub>50</sub>* la concentración a la cual se potencia el 50% de la corriente, *c* es la concentración del compuesto y *n* es el coeficiente de Hill.

### 5.3 Compuesto BL-1249

El BL-1249 (B2186, Sigma) ((5,6,7,8-Tetrahydro-naphthalen-1-yl)-[2-(1H-tetrazol-5-yl)-phenyl]-amine) fue almacenados a -20°C en un stock disuelto en DMSO y a una concentración de 100 mM. Para los experimentos electrofisiológicos el BL-1249 se disolvió a la concentración deseada en solución extracelular normal de registro.

Los compuestos fueron aplicados directamente a la célula de interés mediante un sistema de perfusión por gravedad VC-6 acoplado a un controlador de vías (SF-77B, Warner Instruments).

#### 5.4 Análisis estadístico

Todos los resultados fueron graficados y analizados usando los paquetes de software Origin 2016 (OriginLab). Para el análisis estadístico se usaron pruebas *t-student* para datos pareados y *pruebas* de tendencia.

**Tabla 1. Soluciones de registro.** Concentraciones de los diferentes reactivos contenidas en la solución extracelular e intracelular expresados en mM.

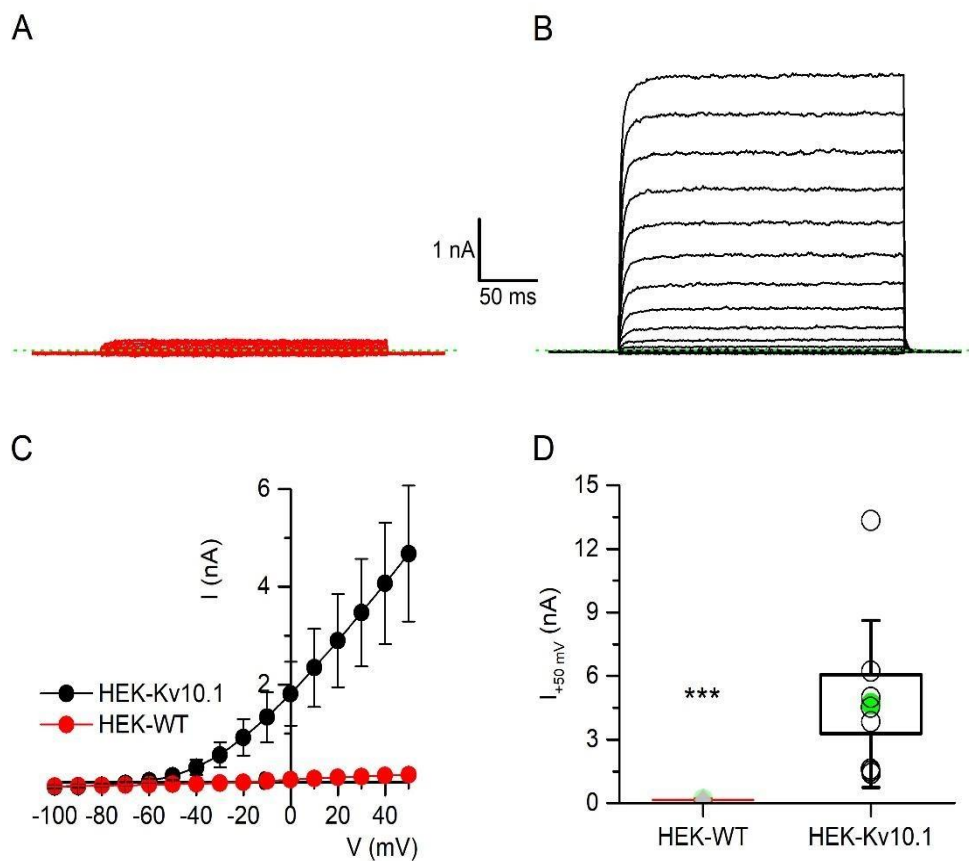
Reactivos	Solución intracelular [mM]	Solución extracelular [mM]
KCl	140	5.4
NaCl	-	140
MgCl <sub>2</sub>	1	1.2
EGTA	10	-
HEPES	10	10
Glucosa	-	10
CaCl <sub>2</sub>	-	2
pH	7.2 con KOH	7.4 con NaOH
Osmolaridad	300 mOsm	300 mOsm

## 6. Resultados

### 6.1 Corrientes macroscópicas en las células HEK-Kv10.1 vs HEK-293 silvestre

El primer abordaje experimental que se realizó fue la caracterización electrofisiológica entre las corrientes macroscópicas generadas en las líneas celulares HEK293 silvestres (de ahora en adelante abreviada como HEK-WT) y la línea celular HEK293 con la transfección estable del canal de K<sup>+</sup> Kv10.1 (HEK-Kv10.1). Para la caracterización de las corrientes iónicas generadas entre ambos tipos celulares, se realizó una serie de pulsos despolarizantes, los cuales permitieron observar que las corrientes eran muy diferentes (Figura 5A-B). Las corrientes iónicas generadas por las células HEK-WT no parecen ser debidas a la expresión endógena de ningún canal iónico dependiente de voltaje, y por la forma su gráfica corriente vs voltaje (IV), su comportamiento fue lineal, atribuible probablemente a la expresión de conductancias de fuga (Figura 5A y C). Por otra parte, las células HEK-Kv10.1 generaban corrientes iónicas con características similares a las descritas en la literatura para el canal Kv10.1, con corrientes que incrementaban su amplitud conforme el potencial de membrana se despolarizaba y no mostraba inactivación durante todo el pulso de voltaje, la tau ( $\tau$ ) de activación de las corrientes medidas a +50 mV fue de  $4.5 \pm 0.9$  ms ( $n = 11$ ) y al realizar la gráfica IV se observó que las corrientes tenían un comportamiento rectificante de salida (más corriente a voltajes positivos que a negativos), similar a lo descrito en la literatura (Figura 5B-C). Para realizar el análisis estadístico se cuantificó la amplitud de las corrientes generadas a +50 mV, siendo de  $0.2 \pm 0.01$  en las células HEK-WT

(n = 12) y de  $4.7 \pm 1.4$  nA en las células HEK.Kv10.1 (n = 9), dichos valores fueron estadísticamente significativos (Figura 5D). Además de estas características, las células HEK con expresión estable del canal Kv10.1 desplazaron  $\sim 44$  mV su PMR hacia valores más negativos con respecto a las células WT (ver tabla 2); dicho PMR fue cercano al potencial de equilibrio para el ion  $K^+$ . Estos resultados en su conjunto muestran que las células HEK-Kv10.1 expresan de forma funcional el canal de  $K^+$  Kv10.1.



**Figura 5. Respuestas electrofisiológicas en células HEK-WT y células HEK-Kv10.1.** En A, registro representativo de las corrientes iónicas registradas en células HEK-WT ante pulsos de voltaje despolarizantes. En B, registro representativo de las corrientes iónicas generadas en células HEK-Kv10.1. En C, gráficas IV de las células HEK-WT (círculo rojo, n = 12) y células HEK-Kv10.1 (círculos negros, n = 9). En D, gráfica de cajas y bigotes de la amplitud de las corrientes generadas a +50 mV en células HEK-WT y HEK-Kv10.1, los círculos grises representan los valores individuales de corriente,

mientras que el promedio está representado por el círculo verde, el cuadro representa el error estándar y los bigotes la desviación estándar. \*\*\* para un valor de  $P < 0.001$ .

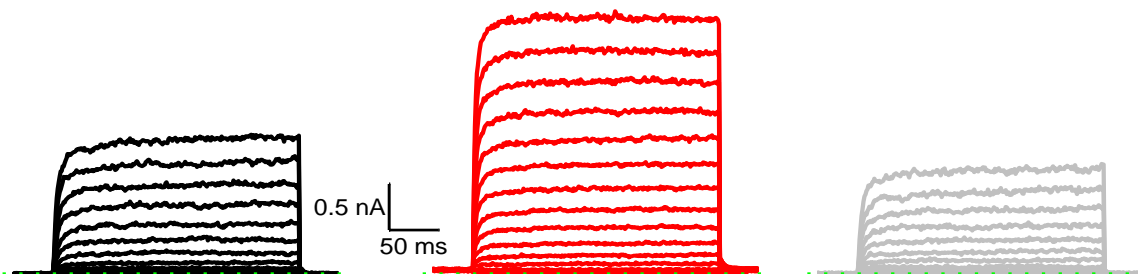
**Tabla 2. Parámetros registrados en células HEK-WT y HEK-Kv10.1.** Los datos entre paréntesis representan el valor de la n.

	PMR (mV)	Capacitancia (pF)	Rm (MΩ)
HEK-WT	$-6.5 \pm 1.1$ (12)	$11.2 \pm 1.0$ (12)	$885.7 \pm 85.7$ (6)
HEK-Kv10.1	$-50.4 \pm 2.2$ (27)	$12.2 \pm 0.8$ (28)	$355.6 \pm 55.2$ (25)
Valor de P	$<0.001$	$>0.05$	$<0.001$

## 6.2 El efecto del BL-1249 sobre las corrientes generadas por el canal Kv10.1

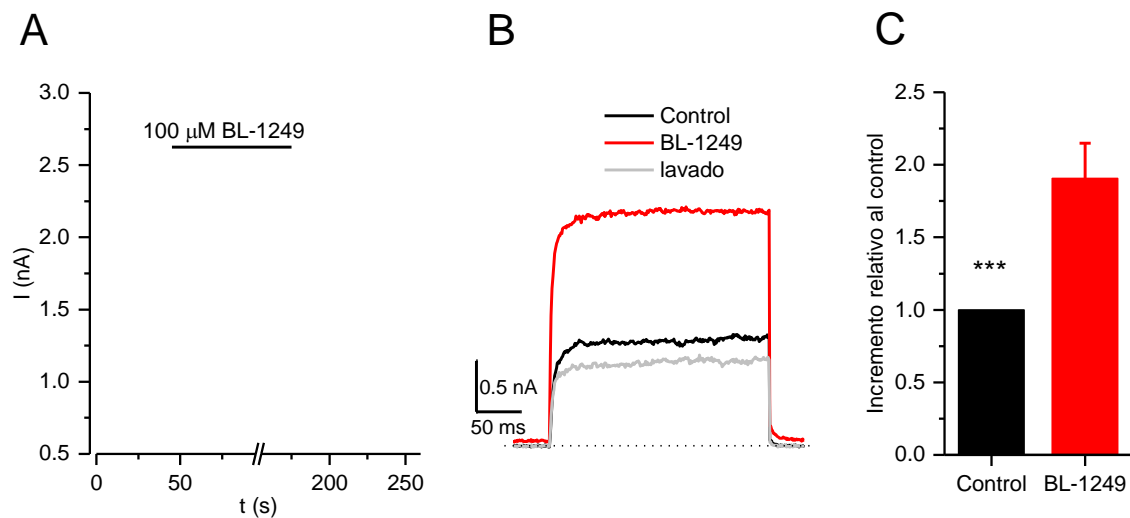
El BL-1249 (BL) es un medicamento antiinflamatorio no esteroideo (AINE) que se ha descrito como un potente activador de los canales de  $K^+$  de fuga K2P2.1 (TREK-1) y K2P10.1 (TREK-2); sin embargo, su mecanismo de acción y sus efectos en otros canales K2P no están bien definidos (Tertyshnikova *et al.*, 2005).

Como se puede observar en la figura 6, la aplicación de  $100 \mu\text{M}$  de BL-1249 produjo un incremento en la amplitud de las corrientes Kv10.1 generadas por un protocolo de pulsos despolarizantes, el efecto potenciador del BL-1249 fue reversible durante el lavado (Figura 6).



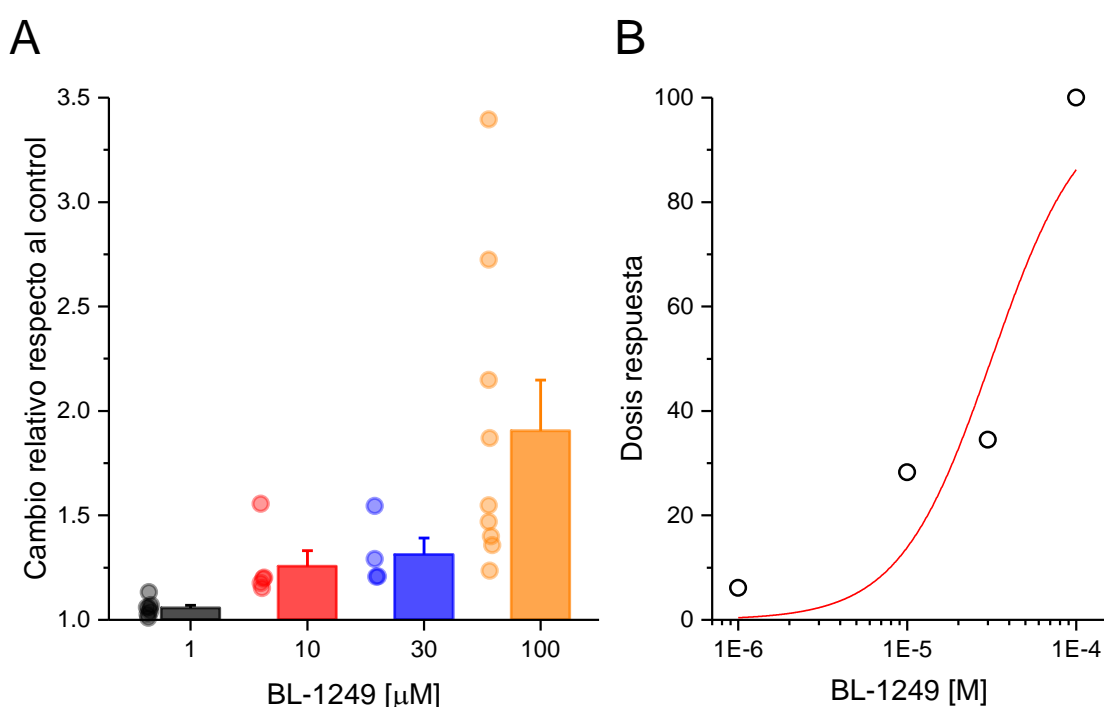
**Figura 6. Efecto del BL-1249 sobre las corrientes Kv10.1.** Figura representativa del efecto del compuesto BL-1249 sobre las corrientes iónicas generadas por el canal Kv10.1. En la figura se muestra la situación control (negro), con 100  $\mu$ M de BL-1249 (rojo) y durante el lavado (gris). La línea punteada en verde representa 0 nA de corriente.

Para realizar el análisis estadístico, se utilizó un pulso de voltaje fijo a +30 mV y se cuantificó la amplitud de las corrientes en la parte estable de la misma. En la figura 7 se puede observar el curso temporal del efecto, en presencia de 100  $\mu$ M de BL-1249 se obtuvo que las corrientes Kv10.1 era en promedio 2 veces más grandes en amplitud que las corrientes control, pasando de  $2.9 \pm 0.9$  nA en control a  $4.4 \pm 1.1$  con BL-1249 ( $n = 9$ ;  $p < 0.001$ ) (Figura 7 C).



**Figura 7. Efecto del BL-1249 sobre las corrientes Kv10.1 generadas con un pulso fijo a +30 mV.** En A, curso temporal del efecto de BL-1249 (100  $\mu$ M) sobre las corrientes Kv10.1 generadas con un pulso despolarizante a +30 mV. Se puede observar que cuando se aplica el BL-1249 la corriente generada por el Kv10.1 se incrementa significativamente. En B, registros electrofisiológicos del canal Kv10.1 bajo 3 condiciones: en control (trazo negro), con BL-1249 (trazo rojo) y lavado (trazo gris). El color de los trazos electrofisiológicos se corresponde con los círculos de colores en la figura A. En C, gráfica de barras del efecto potenciador del BL-1249 sobre la corriente medida a +30 mV. Los datos están normalizados respecto al control ( $n = 9$ ). \*\*\* para un valor de  $P < 0.001$ .

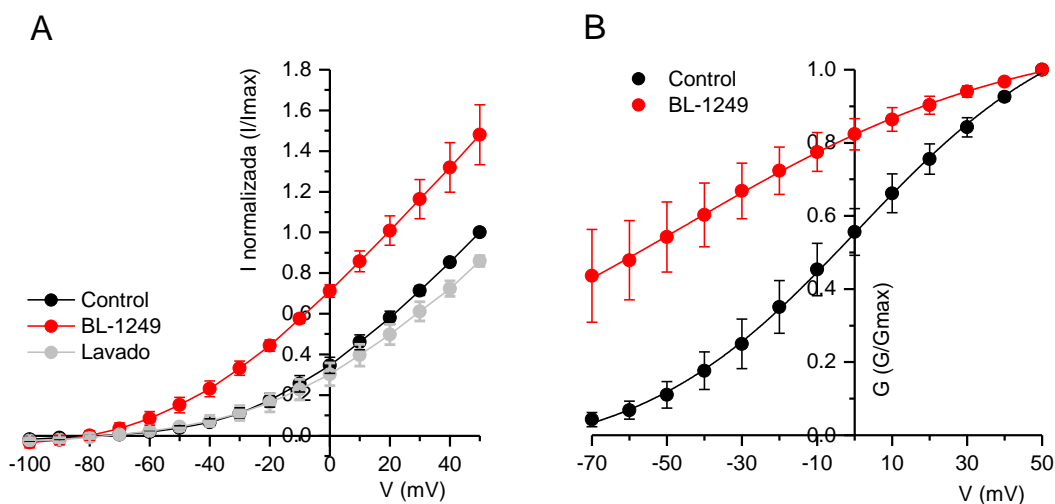
Usando el mismo protocolo, pero a diferentes concentraciones de BL-1249, se observó que el efecto potenciador fue dependiente de la concentración (*test* de tendencia:  $P < 0.01$ ) (Figura 8A). Además, con estos datos se construyó la curva dosis-respuesta para determinar la  $EC_{50}$  del BL-1249. Los porcentajes de potenciación del BL-1249 fueron ajustados con la ecuación de Hill, arrojando un valor de  $EC_{50} = 31.5 \pm 11.5 \mu\text{M}$  (Figura 8B).



**Figura 8. Efecto dosis-dependiente del BL-1249 sobre las corrientes Kv10.1.** En A, las gráficas de barras representan el promedio y el error estándar del efecto del BL-1249; los círculos de colores representan el efecto del BL-1249 en cada célula a una concentración dada y los cuales se encuentran normalizados respecto a su respuesta control. Se ensayaron las concentraciones 1 ( $n = 7$ ), 10 ( $n = 5$ ), 30 ( $n = 4$ ) y 100 ( $n = 9$ )  $\mu\text{M}$  y se realizó una prueba de tendencia para evaluar si el efecto potenciador era dependiente de la concentración ( $P < 0.01$ ). En B, Gráfica dosis-respuesta del BL-1249, la línea sólida de color rojo representa el ajuste con la ecuación de Hill.



Con los datos obtenidos en el protocolo de pulsos despolarizantes se construyeron las curvas IV (Figura 9A), para posteriormente realizar en análisis de conductancia (Figura 9B). En presencia de 100  $\mu\text{M}$  de BL, se observó que el  $V_{1/2}$  de activación se desplazó hacia valores más negativos ( $\Delta 44$  mV), de  $0.6 \pm 1.1$  mV en situación control a  $-44.9 \pm 6.2$  en presencia de BL-1249 (Figura 9 B;  $n = 5$ ).

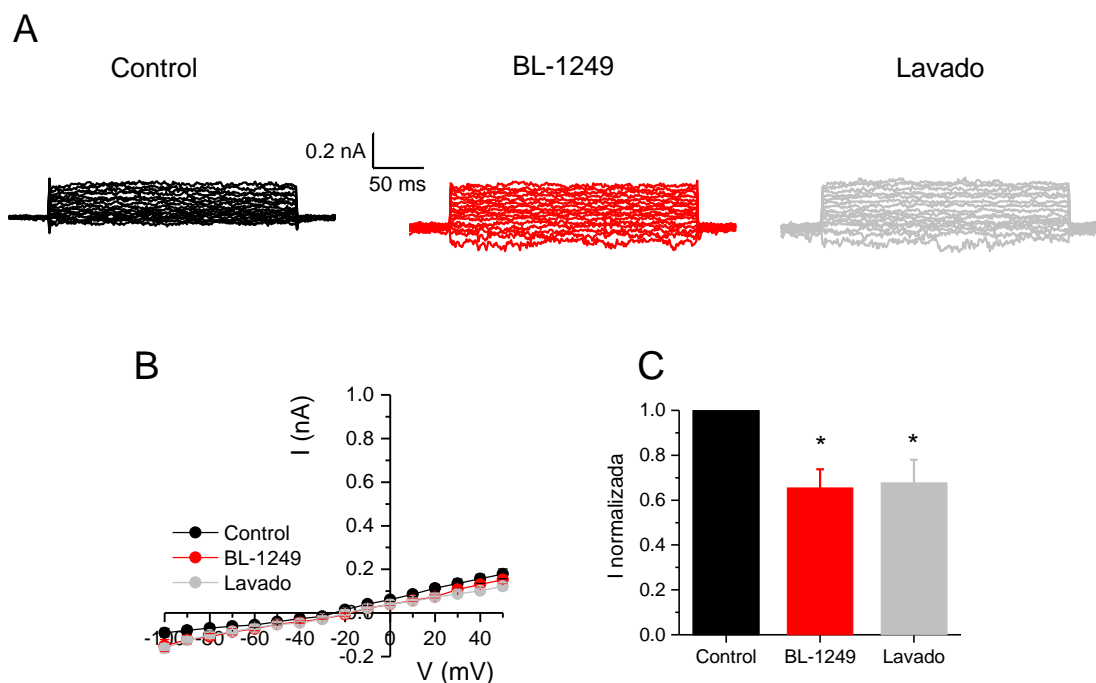


**Figura 9. Efecto del BL-1249 sobre el canal Kv10.1.** En A, gráficas IV normalizadas del efecto del BL-1249 sobre las corrientes Kv10.1. Las corrientes se encuentran normalizadas con respecto a la corriente máxima en la condición control. Se muestran las condiciones control (círculos negros), en presencia de 100  $\mu\text{M}$  de BL-1249 (círculos rojos) y durante el lavado (círculos grises); los datos representan el promedio y el error estándar de 5 células. En B, gráficas de conductancia normalizada ( $G/G_{\text{max}}$ ), en la situación control (círculos negros) y en presencia de BL-1249 (círculos rojos). Los datos en control y con BL-1249 fueron ajustados con la ecuación de Boltzmann (línea negra y roja); los datos representan el promedio y el error estándar de 5 células.

### 6.3 Efecto del BL-1249 sobre las corrientes endógenas en las células HEK-WT

Para corroborar que el efecto del BL-1249 fuera específicamente sobre la actividad del canal Kv10.1 se realizaron la misma serie de experimentos sobre las células HEK-WT. Como se puede observar en la figura 10A-B, el BL-1249 a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  ( $n = 6$ ) no tuvo un efecto aparente sobre las corrientes endógenas registradas en las células HEK-WT. Para realizar el análisis estadístico,

se realizó el protocolo de pulsos fijos a +30 mV y se comparó la amplitud de las respuestas. En la figura 10C se observa, que contrario a lo sucedido en las células HEK-Kv10.1, el BL-1249 produjo una reducción estadísticamente significativa sobre la amplitud de las corrientes endógenas aproximadamente en un 34%, de  $0.14 \pm 0.02$  nA en control a  $0.09 \pm 0.01$  nA en presencia del BL-1249 ( $p < 0.05$ ;  $n = 6$ ). Dicho efecto no fue reversible durante el lavado. Con esto resultados podemos concluir que el efecto potenciador o activador observado en las células HEK-Kv10.1 fue mediado directamente sobre la actividad del canal Kv10.1.



**Figura 10. Efecto del BL-1249 sobre las células HEK-WT.** En A, figura representativa del efecto del compuesto BL-1249 sobre las corrientes endógenas en células HEK-WT. En la figura se muestra la situación control (negro), con 100  $\mu$ M de BL-1249 (rojo) y durante el lavado (gris). En B, gráfica IV de las corrientes endógenas en células HEK-WT en las situaciones control (círculos negros), 100  $\mu$ M de BL-1249 (círculos rojos) y el lavado (círculos grises) ( $n = 6$ ). En C, efecto del BL-1249 sobre las corrientes generadas a +30 mV. Los datos están normalizados con respecto al valor de la corriente control ( $n = 6$ ). \* para una  $P < 0.05$ .

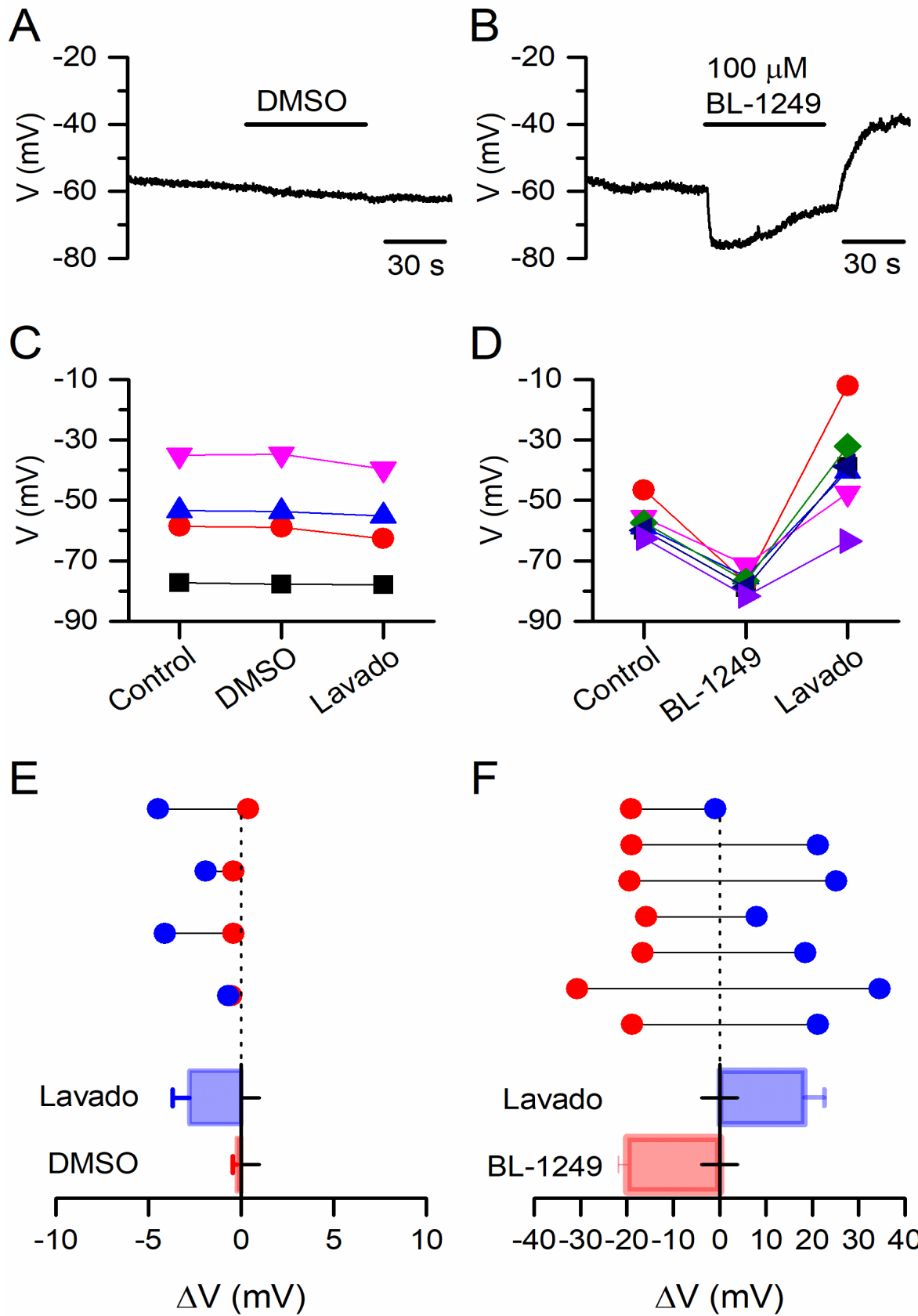
#### **6.4 Efecto del BL-1249 sobre el potencial de membrana de las células HEK-Kv10.1**

Finalmente, para determinar si la potenciación de la actividad del canal Kv10.1 debido a la aplicación del BL-1249 podría tener algún efecto sobre el PMR de las células, se decidió realizar registros electrofisiológicos en la modalidad de fijación de corriente. El protocolo consistió en dejar libre el PMR de las células, desde este punto se realizó 1 minuto de registro control, 1 minuto de registro en presencia del BL-1249 o del vehículo (DMSO) y 1 minuto de lavado (Figura 11A-B). Lo primero que se ensayó fue el efecto del DMSO (vehículo en cual se disuelve el BL-1249) para descartar un efecto de este sobre el PMR de las células. En presencia de DMSO, las células no modificaron significativamente su PMR, siendo de  $-56.1 \pm 8.7$  mV en control y de  $-56.3 \pm 8.9$  mV con DMSO (lo que representaba una diferencia de potencial o delta ( $\Delta$  mV) de  $-0.23$  mV;  $n = 4$ ;  $P > 0.05$ ) (Figura 11A, C y E). Durante esta serie de experimentos se observó que el PMR se iba hiperpolarizando conforme transcurría el experimento, sin embargo, el cambio no fue estadísticamente significativo al final del protocolo ( $P > 0.05$ ), existiendo una diferencia de potencial ( $\Delta$ ) de  $-2.8$  mV durante el lavado (Figura 11E).

Una vez descartado el efecto de DMSO se ensayó el compuesto de interés, y como se puede observar en la figura 11B, la aplicación de BL-1249 ( $100 \mu\text{M}$ ) produjo, una hiperpolarización del PMR rápida y estadísticamente significativa, de  $-57.3 \pm 2.0$  mV en la situación control a  $-77.2 \pm 1.2$  mV en presencia del BL-1249 ( $n = 7$ ;  $P < 0.001$ ), lo que se corresponde a una diferencia ( $\Delta$ ) de  $-19.9 \pm 1.9$  mV (Figura 11D y F); dicha hiperpolarización no fue estable durante el minuto que se aplicó el BL, observándose un intento lento de regreso al PMR original. Durante el lavado, se

observó que el PMR sufría un “rebote”, haciendo que este fuera más despolarizado que durante la situación control, siendo de  $-39.0 \pm 5.9$  mV, es decir un  $\Delta$  de  $+18.3 \pm 4.4$  mV ( $n = 7$ ;  $P < 0.001$ ) (Figura 11 F).

**Figura 11. Efecto del BL-1249 sobre el PMR de las células HEK-Kv10.1.** En A y B, trazos representativos de los experimentos sobre el PMR de células HEK-Kv10.1 en presencia de DMSO (A) y 100  $\mu$ M de BL-1249 (B). En C, valores del voltaje de membrana de 4 células en la condición control, con DMSO y lavado. En D, valores de voltaje de membrana de 7 células en la condición control, con BL-1249 y durante el lavado. En E y F, diferencias de voltaje respecto al valor control ( $\Delta$  mV) de las 4 células tratadas con DMSO (E) y las 7 tratadas con BL12-49. Cada círculo se corresponde a una célula; los círculos rojos se corresponden a los valores con DMSO o BL-1249 y los círculos azules a los valores obtenidos durante el lavado. Un  $\Delta$  negativo significa una hiperpolarización del PMR y un  $\Delta$  positivo una despolarización de éste. La gráfica de barras horizontal debajo de los círculos representa el promedio y el error estándar del  $\Delta$  de mV producido en cada condición experimental (ver página siguiente).



## 7. Discusión

Los canales iónicos se expresan en prácticamente todos los tejidos del cuerpo humano, por tanto, no es sorprendente que estas proteínas causen (de forma directa o al ser moduladas farmacológicamente) diversas patologías (canalopatías). En los últimos años, las herramientas farmacológicas (tanto las selectivas como las que no lo son) junto con las técnicas de biología molecular que permiten manipular la actividad de los canales iónicos, han incrementado nuestro conocimiento sobre cómo funcionan, además, nos han permitido conocer de manera directa el papel real de un canal iónico tanto en la fisiología como en la patología.

A nivel farmacológico, el uso de agonistas (activadores) o antagonistas (inhibidores, bloqueadores) de canales iónicos son una herramienta de vital importancia para ensayar y validar el papel funcional de diversos canales iónicos en células y tejidos específicos. Los efectos que los agonistas o antagonistas tengan sobre la fisiología o fisiopatología celular o tisular pueden indicar que un canal iónico puede ser considerado como blanco molecular para tratar determinadas enfermedades. Además, tanto los agonistas como los antagonistas de los canales iónicos son herramientas farmacológicas que permiten conocer las propiedades biofísicas de los canales iónicos como: los sitios alostéricos de modulación de un canal y los mecanismos de cierre y apertura de éstos.

La manipulación farmacológica de los canales de  $K^+$ , a través del uso de activadores, podría ayudar a tratar diversas enfermedades como son la epilepsia, las arritmias cardíacas y/o el dolor neuropático (Lawson, 2000; Judge et al., 2007).

## 7.1 El primer activador de Kv10.1

Desde su descripción, como pieza clave en la carcinogénesis de diversos orígenes (Pardo et al., 1999), el canal de K<sup>+</sup> Kv10.1 ha sido propuesto como una diana molecular para el desarrollo de compuestos que ayuden a mitigar muchas de las características propias de células tumorales (proliferación, migración, angiogénesis, entre otros). Desde su descubrimiento como promotor de la carcinogénesis, el canal Kv10.1 se ha ideado como un blanco farmacológico para tratar el cáncer, y gran parte del trabajo científico se ha centrado en la búsqueda de compuestos que disminuyan la actividad del canal, sin embargo, en esta tesis yo me enfocó en la estudiar si el compuesto BL-1249 tuviera un efecto potenciador o activador del Kv10.1, como lo ha demostrado en otros canales de K<sup>+</sup>. Los resultados obtenidos en esta tesis muestran por primera vez a un compuesto, el BL-1249, que potencia la actividad del canal Kv10.1 y que también puede hiperpolarizar el potencial de membrana en reposo de las células que expresan este canal; dichos efectos estuvieron ausentes cuando el BL-1249 (a la máxima concentración ensayada) se aplicó en células HEK-293 silvestres, lo que sugiere un efecto directo del compuesto sobre el Kv10.1. En la literatura existen reportes acerca de la expresión endógena de canales iónicos dependientes de voltaje de K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> en las células HEK-293 silvestres (He & Soderlund, 2010; Berjukow et al., 1996; Jiang et al., 2002), sin embargo, en nuestras condiciones experimentales no se observó la expresión funcional de estos. Si bien, los registros electrofisiológicos en células HEK-WT mostraron la presencia de corrientes del tipo “leak” o de fuga, la aplicación del BL-1249 produjo una reducción significativa de estas corrientes.

El BL-1249 es un antiinflamatorio no esteroideo, que ha sido descrito como un activador de los canales de K<sup>+</sup> del tipo K2P, TREK-1 y TREK-2, el cual a través de ensayos de influjo de talio (un ensayo de fluorescencia, que permite evaluar la actividad de canales de K<sup>+</sup> a través del movimiento del ion talio) mostro tener unas EC<sub>50</sub> de ~5 μM y ~8 μM, respectivamente (Iwaki et al., 2019). En nuestros experimentos, la EC<sub>50</sub> del BL-1249 sobre el canal Kv10.1 fue aproximadamente 6 veces más grande que los reportados para TREK-1 y TREK-2, no obstante, el método empleado para calcular esos valores fue diferente. Además de los ensayos de fluorescencia arriba mencionados, se han realizado ensayos *in vitro* de la vejiga de rata, los cuales han reportado que el BL-1249 tiene un efecto relajante sobre el tono muscular de la vejiga, a través de un mecanismo que involucra la activación de canales de K<sup>+</sup> (del tipo K2P) y por consiguiente la hiperpolarización del potencial de membrana en reposo de células musculares de este órgano (Tertyshnikova et al., 2005).

## **7.2 El potencial de membrana en reposo, el cáncer y el Kv10.1**

La respuesta a la pregunta de ¿por qué un activador del canal Kv10.1 puede ser útil en el estudio de la biología del cáncer? está relacionada con el potencial de membrana en reposo de las células tumorales (células con alta tasa de proliferación), el cual en la mayoría de los casos se encuentra más despolarizado en comparación con células quiescentes (Yang & Brackenbury, 2013; Kadir et al., 2018). Por tal razón, se ha sugerido que el potencial de membrana en reposo de células tumorales puede ser usado como un nuevo marcador o característica distintiva de éstas (Berzingi et al., 2016).



Desde 1963, se ha puesto un mayor énfasis en el papel de los canales iónicos sobre el potencial de membrana de células excitables (neuronas o miocitos), sin embargo, el papel del PMR en célula no excitables (que no generan potenciales de acción) se desconocía y se prestaba a la especulación; no obstante, diversos trabajos muestran que el potencial de membrana puede estar asociado a diversas funciones biológicas, entre ellos el ciclo celular y por consiguiente la proliferación.

Diversas comparaciones, tanto *in vitro* como *in vivo*, entre células normales contra células cancerígenas de diversos tejidos, han mostrado que éstas últimas tienden a tener PMR más despolarizados. En células MCF-7 de cáncer de mama y la línea celular de neuroblastoma C1300, se observó que el PMR de las células se correlaciona con las fases del ciclo celular; cuando las células eran arrestadas/detenidas en la transición de G1/S o G2/M el potencial de membrana se encontraba hiperpolarizado, mientras que si las células se arrestaban en la fase G0 /G1 y en M las células estaban despolarizadas (Wonderlin et al., 1995); por tanto, parece que la progresión del ciclo celular está acompañada de oscilaciones rítmicas del PMR, transitando entre estados hiperpolarizados y despolarizados (Yang & Brackenbury, 2013). Dadas las diversas evidencias experimentales se ha hipotetizado que canales iónicos dependientes de voltaje juega un papel importante en modificar el PMR durante el ciclo celular (proliferación). En este sentido, el canal Kv10.1 muestra un incremento en su expresión en diversos tipos de tumores (Hemmerlein et al., 2006) y su expresión se ha asociado a diferentes estadios del ciclo celular (Sánchez *et al*, 2016; Urrego *et al*, 2014). Por ello, la manipulación farmacológica de este canal, usando activadores, favorecería la hiperpolarización

del potencial de membrana de las células tumorales, efecto observado en nuestros experimentos, y que posiblemente puede detener o hacer más lenta la proliferación celular de células tumorales que expresen el canal Kv10.1. Adicionalmente, se puede hipotetizar que la hiperpolarización, debida a la activación del canal Kv10.1, disminuiría la actividad de canales de calcio dependientes de voltaje (expresados también en células tumorales) (Mortensen et al., 2015), como resultado existiría una disminución de calcio intracelular el cual juega un papel clave en la carcinogénesis.

### **7.3 Posible mecanismo de acción del BL-1249 sobre el Kv10.1**

Los canales de K<sup>+</sup> han evolucionado para responder a múltiples estímulos (voltaje, temperatura, segundos mensajeros, etc), así que se piensa que la activación farmacológica de estos puede ser a través de mecanismos en común. En el caso de los compuestos cargados negativamente, como es el caso del BL-1249, se ha reportado que estos se unen a un sitio por debajo del filtro de selectividad, lo que ocasiona un incremento en el tamaño de poro y un incremento de iones K<sup>+</sup> ocupando el filtro de selectividad, lo que finalmente favorece la apertura del canal (Schewe et al., 2019). Este fenómeno se observó en el canal Kv11.1, el cual pertenece a la subfamilia de canales EAG, a la cual también pertenece el Kv10.1, y debido a que ambos canales presentan similitudes a nivel estructural (Wang & MacKinnon, 2017; Whicher & MacKinnon, 2016; Barros et al., 2020), podemos hipotetizar que el efecto del BL-1249 en ambos, puede ser a través del mismo mecanismo.

Como se observó en los registros de fijación de voltaje y fijación de corriente, el efecto potenciador del BL-1249 (a 100 µM) parece tener un efecto bifásico, ya que

en presencia del compuesto, en ambos protocolos experimentales, tanto la corriente como el voltaje tienden a disminuir con el tiempo. Esto puede sugerir que el compuesto BL-1249 puede tener diversos sitios de unión al canal Kv10.1. Esto se puede ejemplificar en el trabajo de Pope y colaboradores (2018), donde ellos describen que el BL-1249 ejerce su efecto sobre los canales K2P TREK1 y TREK2, a través de su unión con diversas regiones del canal (Pope et al., 2018); mediante ensayos electrofisiológicos y de biología molecular (usando diversas quimeras de canales TREK-1 y TRAAK), ellos demuestran que el BL-1249 tiene dos grupos importantes (tetrazol y tetralina) que son determinantes para el efecto del compuesto, además de que el efecto potenciador sobre los canales TREK es mediado por al menos 3 regiones diferentes de dicho canal, siendo determinantes algunos aminoácidos presentes en el segmento transmembranal M2 de cada subunidad, la región por debajo del filtro de selectividad y la parte inicial de la región C-terminal (Pope et al., 2018). Sin embargo, para concluir efectos similares en el canal Kv10.1 más estudios deben realizarse.

#### **7.4 Perspectivas de trabajo**

- Estudiar el efecto del BL-1249 sobre el potencial de membrana de las células HEK-Kv10.1 en un tratamiento crónico (>24 h de incubación).
- Determinar si la aplicación de BL-1249 produce un cambio en la expresión del canal Kv10.1 (expresión en membrana, nivel de mRNA, tráfico del canal)
- Evaluar ensayos de competencia o sinergia con bloqueadores del canal Kv10.1 (ej. astemizole).

- Estudiar si la potenciación de la actividad del canal Kv10.1 con BL-1249 disminuye la tasa de proliferación, migración o viabilidad de células con expresión del canal Kv10.1, entre ellas células derivadas de tumores.

## 8. Conclusiones

1. El BL-1249 ejerce un efecto potenciador sobre la actividad del canal Kv10.1.
2. El BL-1249 desplaza el  $V_{1/2}$  de activación del canal Kv10.1 hacia valores de potencial de membrana más negativos.
3. El efecto del BL-1249 es dependiente de la concentración.
4. El efecto observado en las células HEK-Kv10.1 es específico sobre el canal Kv10.1 ya que no tuvo efecto en la línea celular HEK-293 silvestre.
5. Este es el primer reporte de un compuesto con actividad potenciadora (*opener*) sobre el canal Kv10.1.

## 9. Bibliografía

- Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, y Peter Walter. (2015). *Molecular Biology of the Cell*. Sixth Edit. Garland Science.
- Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, y Peter Walter. (2002). "Ion Channels and the Electrical Properties of Membranes".
- Armijo Simón, Juan Antonio, M<sup>a</sup>. Isabel de las Cuevas Terán, y Javier Adín Ibarra. 2000. "Canales iónicos y epilepsia". *Revista de Neurología* 30(S1):25. doi: 10.33588/rn.30s1.2000133.
- Bagal, S. K., Brown, A. D., Cox, P. J., Omoto, K., Owen, R. M., Pryde, D. C., Sidders, B., Skerratt, S. E., Stevens, E. B., Storer, R. I., & Swain, N. A. (2013). Ion channels as therapeutic targets: A drug discovery perspective. In *Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 56, Issue 3, pp. 593–624). <https://doi.org/10.1021/jm3011433>
- Barros, F., de la Peña, P., Domínguez, P., Sierra, L. M., & Pardo, L. A. (2020). The EAG Voltage-Dependent K<sup>+</sup> Channel Subfamily: Similarities and Differences in Structural Organization and Gating. *Frontiers in Pharmacology*, 11(April), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00411>
- Bauer, C. K., & Schwarz, J. R. (2018). Ether-à-go-go K<sup>+</sup> channels: effective modulators of neuronal excitability. *The Journal of Physiology*. <https://doi.org/10.1113/JP275477>
- Berjukow, S., Döring, F., Froschmayr, M., Grabner, M., Glossmann, H., & Hering, S. (1996). Endogenous calcium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells. *British Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15463.x>
- Berzingi, S., Newman, M., & Yu, H. G. (2016). Altering bioelectricity on inhibition of human breast cancer cells. *Cancer Cell International*. <https://doi.org/10.1186/s12935-016-0348-8>
- Cahalan, M. D., Wulff, H., & Chandy, K. G. (2001). Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system. In *Journal of Clinical Immunology* (Vol. 21, Issue 4, pp. 235–252). Springer. <https://doi.org/10.1023/A:1010958907271>
- Camacho, J. (2006a). Ether à go-go potassium channels and cancer. In *Cancer Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.02.016>
- Carrizosa, Jaime. 2006. "Canalopatías epilépticas Revisión". *Acta Neurol COLOMBIA* 22(3):118–26.
- Cázares-Ordoñez, V., & Pardo, L. A. (2017). Kv10.1 potassium channel: from the brain to the tumors. *Biochemistry and Cell Biology*, 95(5), 531–536. <https://doi.org/10.1139/bcb-2017-0062>

- Chen, Y., Sánchez, A., Rubio, M. E., Kohl, T., Pardo, L. A., & Stühmer, W. (2011). Functional Kv10.1 Channels Localize to the Inner Nuclear Membrane. *PLoS ONE*, 6(5), e19257. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019257>
- Clare, J. J. (2010). Targeting ion channels for drug discovery. In *Discovery medicine* (Vol. 9, Issue 46, pp. 253–260).
- Downie, B. R., Sánchez, A., Knötgen, H., Contreras-Jurado, C., Gymnopoulos, M., Weber, C., Stühmer, W., & Pardo, L. A. (2008). Eag1 expression interferes with hypoxia homeostasis and induces angiogenesis in tumors. *Journal of Biological Chemistry*, 283(52), 36234–36240. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801830200>
- García-Ferreiro, R. E., Kerschensteiner, D., Major, F., Monje, F., Stühmer, W., & Pardo, L. A. (2004). Mechanism of Block of hEag1 K<sup>+</sup> Channels by Imipramine and Astemizole. *The Journal of General Physiology*. <https://doi.org/10.1085/jgp.200409041>
- García-Quiroz, J., & Camacho, J. (2011). Astemizole: an old anti-histamine as a new promising anti-cancer drug. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*.
- Gavrilova-Ruch, O., Schönherr, K., Gessner, G., Schönherr, R., Klapperstück, T., Wohlrab, W., & Heinemann, S. H. (2002). Effects of imipramine on ion channels and proliferation of IGR1 melanoma cells. *Journal of Membrane Biology*. <https://doi.org/10.1007/s00232-001-0181-3>
- Gómez-Lagunas, F., Carrillo, E., Pardo, L. A., & Stühmer, W. (2017). Gating Modulation of the Tumor-Related Kv10.1 Channel by Mibefradil. *Journal of Cellular Physiology*, 232(8), 2019–2032. <https://doi.org/10.1002/jcp.25448>
- Gómez-Varela, D., Contreras-Jurado, C., Furini, S., García-Ferreiro, R., Stühmer, W., & Pardo, L. A. (2006). Different relevance of inactivation and F468 residue in the mechanisms of hEag1 channel blockage by astemizole, imipramine and dofetilide. *FEBS Letters*, 580(21), 5059–5066. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.08.030>
- Gómez-Varela, D., Zwick-Wallasch, E., Knötgen, H., Sánchez, A., Hettmann, T., Ossipov, D., Weseloh, R., Contreras-Jurado, C., Rothe, M., Stühmer, W., & Pardo, L. A. (2007). Monoclonal antibody blockade of the human Eag1 potassium channel function exerts antitumor activity. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0107>
- Gutman, G. A., Chandy, K. G., Grissmer, S., Lazdunski, M., Mckinnon, D., Pardo, L. A., Robertson, G. A., Rudy, B., Sanguinetti, M. C., Stühmer, W., & Wang, X. (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. In *Pharmacological Reviews*. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.10>

- He, B., & Soderlund, D. M. (2010). Human embryonic kidney (HEK293) cells express endogenous voltage-gated sodium currents and Nav1.7 sodium channels. *Neuroscience Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.12.012>
- Hegle, A. P., Marble, D. D., & Wilson, G. F. (2006). A voltage-driven switch for ion-independent signaling by Ether-à-go-go K<sup>+</sup> channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2886–2891. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505909103>
- Hemmerlein, B., Weseloh, R. M., de Queiroz, F. M., Knötgen, H., Sánchez, A., Rubio, M. E., Martin, S., Schliephacke, T., Jenke, M., Heinz-Joachim-Radzun, Stühmer, W., & Pardo, L. A. (2006). Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours. *Molecular Cancer*. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-5-41>
- Herlaar, E., y Z. Brown. 1999. “p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease”. *Molecular Medicine Today* 5(10):439–47.
- Hernandez-Resendiz, I., Hartung, F., & Pardo, L. A. (2019). Antibodies Targeting K<sup>V</sup> Potassium Channels: A Promising Treatment for Cancer . *Bioelectricity*. <https://doi.org/10.1089/bioe.2019.0022>
- Hille, B. (2001). Ion Channel Excitable Membranes. In *Sunderland Massachusetts USA* (pp. 1–37). [https://doi.org/10.1007/3-540-29623-9\\_5640](https://doi.org/10.1007/3-540-29623-9_5640)
- Huang, X., & Jan, L. Y. (2014). Targeting potassium channels in cancer. *Journal of Cell Biology*, 206(2), 151–162. <https://doi.org/10.1083/jcb.201404136>
- Issbrücker, Katja, Hugo H. Martin, Stefan Hippenstiel, Georg Springmann, Robert Voswinckel, Andreas Gaumann, Georg Breier, Hannes C. A. Drexler, Norbert Suttrop, y Matthias Clauss. 2003. “p38 MAP Kinase—a molecular switch between VEGF-induced angiogenesis and vascular hyperpermeability”. *The FASEB Journal* 17(2):262–64. doi: 10.1096/fj.02-0329fje.
- Iwaki, Y., Yashiro, K., Kokubo, M., Mori, T., Wieting, J. M., McGowan, K. M., Bridges, T. M., Engers, D. W., Denton, J. S., Kurata, H., & Lindsley, C. W. (2019). Towards a TREK-1/2 (TWIK-Related K<sup>+</sup> Channel 1 and 2) dual activator tool compound: Multi-dimensional optimization of BL-1249. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 29(13), 1601–1604. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.04.048>
- Jiang, B., Sun, X., Cao, K., & Wang, R. (2002). Endogenous Kv channels in human embryonic kidney (HEK-293) cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1023/A:1019907104763>
- Jin, Xiaochun, y Robert W. Gereau IV. 2006. “Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor- $\alpha$ ”. *Journal of Neuroscience* 26(1):246–55. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3858-05.2006.
- Judge, S. I. V., Smith, P. J., Stewart, P. E., & Bever, C. T. (2007). Potassium channel blockers and openers as CNS neurologic therapeutic agents. In *Recent*



*Patents on CNS Drug Discovery.*  
<https://doi.org/10.2174/157488907782411765>

- Kadir, L. A., Stacey, M., & Barrett-Jolley, R. (2018). Emerging roles of the membrane potential: Action beyond the action potential. In *Frontiers in Physiology*.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01661>
- Kass, R. S. (2005). The channelopathies: Novel insights into molecular and genetic mechanisms of human disease. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 115, Issue 8, pp. 1986–1989). <https://doi.org/10.1172/JCI26011>
- Kim, June-bum. 2014. "Channelopathies". 57(1):1–18.
- Kuang, Q., Purhonen, P., & Hebert, H. (2015). Structure of potassium channels. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(19), 3677–3693.  
<https://doi.org/10.1007/s00018-015-1948-5>
- Lawson, K. (2000). Potassium channel openers as potential therapeutic weapons in ion channel disease. *Kidney International*. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00923.x>
- Ma, L., Chin, Y. K. Y., Dekan, Z., Herzig, V., Chow, C. Y., Heighway, J., Lam, S. W., Guillemin, G. J., Alewood, P. F., & King, G. F. (2018). Novel venom-derived inhibitors of the human EAG channel, a putative antiepileptic drug target. *Biochemical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.08.038>
- Ma, R., Seifi, M., Papanikolaou, M., Brown, J. F., Swinny, J. D., & Lewis, A. (2018). TREK-1 channel expression in smooth muscle as a target for regulating murine intestinal contractility: therapeutic implications for motility disorders. *Frontiers in physiology*, 9, 157.
- Martin, M. R. (2004). Los canales iónicos: la biología y patología. In *Archivos de Cardiología de Mexico* (Vol. 74, pp. 205–210).
- Martin, S., Lino de Oliveira, C., Mello de Queiroz, F., Stühmer, W., Del Bel, E. (2008). Eag1 potassium channel immunohistochemistry in the CNS of adult rat and selected regions of human brain. *Neuroscience*, 26;155(3):833-44
- Moreels, L., Peigneur, S., Galan, D. T., De Pauw, E., Béress, L., Waelkens, E., Pardo, L. A., Quinton, L. C., & Tytgat, J. (2017). APETx4, a novel sea anemone toxin and a modulator of the cancer-relevant potassium channel Kv10.1. *Marine Drugs*, 15(9). <https://doi.org/10.3390/md15090287>
- Moreels, L., Peigneur, S., Yamaguchi, Y., Vriens, K., Waelkens, E., Zhu, S., Thevissen, K., Cammue, B. P. A., Sato, K., & Tytgat, J. (2016). Expanding the pharmacological profile of k-hefutoxin 1 and analogues: A focus on the inhibitory effect on the oncogenic channel Kv10.1. *Peptides*, 1–8.  
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.08.008>
- Mortensen, L. S., Schmidt, H., Farsi, Z., Barrantes-Freer, A., Rubio, M. E., Ufartes, R., Eilers, J., Sakaba, T., Stühmer, W., & Pardo, L. A. (2015). K V 10.1 opposes activity-dependent increase in Ca<sup>2+</sup> influx into the presynaptic

- terminal of the parallel fibre-Purkinje cell synapse. *The Journal of Physiology*, 593(1), 181–196. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.281600>
- Occhiodoro, T., Bernheim, L., Liu, J. H., Bijlenga, P., Sinnreich, M., Bader, C. R., & Fischer-Lougheed, J. (1998). Cloning of a human ether-a-go-go potassium channel expressed in myoblasts at the onset of fusion. *FEBS Letters*. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00973-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00973-9)
- Ono, Koh, y Jiahuai Han. 2000. “The p38 signal transduction pathway Activation and function”. *Cellular Signalling* 12(1):1–13.
- Ouadid-Ahidouch, H., Ahidouch, A., & Pardo, L. A. (2016). Kv10.1 K<sup>+</sup> channel: from physiology to cancer. In *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* (Vol. 468, Issue 5, pp. 751–762). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00424-015-1784-3>
- Pardo, L. A., & Stühmer, W. (2014). The roles of K<sup>+</sup> channels in cancer. *Nature Reviews. Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc3635>
- Pardo, L. A., Del Camino, D., Sánchez, A., Alves, F., Brüggemann, A., Beckh, S., & Stühmer, W. (1999). Oncogenic potential of EAG K<sup>+</sup> channels. *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.20.5540>
- Pérez, Nuvia, Diaz Ivette, y Maria Martinez. (2017). “Canalopatías, un novedoso enfoque en la fisiopatología del dolor”. *Rev Cubana Pediatría* vol.89 no.
- Peruzzo, R., Biasutto, L., Szabò, I., & Leanza, L. (2016). Impact of intracellular ion channels on cancer development and progression. *European Biophysics Journal*, 45(7), 685–707. <https://doi.org/10.1007/s00249-016-1143-0>
- Pope L, Arrigoni C, Lou H, Bryant C, Gallardo-Godoy A, Renslo AR & Minor DL (2018) Protein and Chemical Determinants of BL-1249 Action and Selectivity for K<sup>+</sup> 2P Channels. *ACS Chem. Neurosci.* 9: 3153–3165 Available at: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines> [Consultado abril 23, 2021]
- Prevarskaya, N., Skryma, R., & Shuba, Y. (2018). Ion channels in cancer: Are cancer hallmarks oncochannelopathies? In *Physiological Reviews*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2016>
- Ramírez-Carretero, S., Vera-Estrella, R., Portillo-Bobadilla, T., Licea-Navarro, A., Bernaldez-Sarabia, J., Rudiño-Piñera, E., Verleyen, J. J., Rodríguez, E., & Rodríguez-Almazán, C. (2019). Transcriptomic and Proteomic Analysis of the Tentacles and Mucus of *Anthopleura dowii* Verrill, 1869. *Marine Drugs*, 17(8). <https://doi.org/10.3390/md17080436>
- Ranjan, R., Logette, E., Marani, M., Herzog, M., Tâche, V., Scantamburlo, E., Buchillier, V., & Markram, H. (2019). A Kinetic Map of the Homomeric Voltage-Gated Potassium Channel (Kv) Family. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00358>

- Rodríguez-Rasgado, J. A., Acuña-Macías, I., & Camacho, J. (2012). Eag1 channels as potential cancer biomarkers. In *Sensors (Switzerland)*. <https://doi.org/10.3390/s120505986>
- Sánchez, A., Urrego, D., & Pardo, L. A. (2016). Cyclic expression of the voltage-gated potassium channel K V 10.1 promotes disassembly of the primary cilium. *EMBO Reports*, 17(5), 708–723. <https://doi.org/10.15252/embr.201541082>
- Sánchez Dr., Margarita Dorantes. (2012). “Canalopatías iónicas: Generalidades y panorámica actual”. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas* 31(1):1–15
- Schewe, M., Sun, H., Mert, Ü., Mackenzie, A., Pike, A. C. W., Schulz, F., Constantin, C., Vowinkel, K. S., Conrad, L. J., Kiper, A. K., Gonzalez, W., Musinszki, M., Tegtmeier, M., Pryde, D. C., Belabed, H., Nazare, M., De Groot, B. L., Decher, N., Fakler, B., ... Baukowitz, T. (2019). A pharmacological master key mechanism that unlocks the selectivity filter gate in K channels. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aav0569>
- Stühmer, W. (2017). El canal de potasio dependiente de voltaje Kv10.1 y el cáncer. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 41(160), 274. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.509>
- Subramanyam, P., & Colecraft, H. M. (2015). Ion channel engineering: Perspectives and strategies. In *Journal of Molecular Biology* (Vol. 427, Issue 1, pp. 190–204). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.09.001>
- Tertyshnikova, S., Knox, R. J., Plym, M. J., Thalody, G., Griffin, C., Neelands, T., Harden, D. G., Signor, L., Weaver, D., Myers, R. A., & Lodge, N. J. (2005). BL-1249 [(5,6,7,8-tetrahydro-naphthalen-1-yl)-[2-(1H-tetrazol-5-yl)-phenyl] - amine]: A putative potassium channel opener with bladder-relaxant properties. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 313(1), 250–259. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.078592>
- Urrego, D., Tomczak, A. P., Zahed, F., Stühmer, W., & Pardo, L. A. (2014). Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1638), 1–9. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0094>
- Wang, W., & MacKinnon, R. (2017). Cryo-EM Structure of the Open Human Ether-à-go-go-Related K<sup>+</sup> Channel hERG. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.048>
- Wang, X., Chen, Y., Zhang, Y., Guo, S., Mo, L., An, H., & Zhan, Y. (2017). Eag1 Voltage-Dependent Potassium Channels: Structure, Electrophysiological Characteristics, and Function in Cancer. In *Journal of Membrane Biology*. <https://doi.org/10.1007/s00232-016-9944-8>

- Whicher, J. R., & MacKinnon, R. (2016). Structure of the voltage-gated K<sup>+</sup> channel Eag1 reveals an alternative voltage sensing mechanism. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8070>
- Wickenden, A., Priest, B., & Erdemli, G. (2012). Ion channel drug discovery: Challenges and future directions. *Future Medicinal Chemistry*, 4(5), 661–679. <https://doi.org/10.4155/fmc.12.4>
- Wonderlin, W. F., Woodfork, K. A., & Strobl, J. S. (1995). Changes in membrane potential during the progression of MCF-7 human mammary tumor cells through the cell cycle. *Journal of Cellular Physiology*. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041650121>
- Wulff, H., Castle, N. A., & Pardo, L. A. (2009). Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. In *Nature Reviews Drug Discovery*. <https://doi.org/10.1038/nrd2983>
- Yang, M., & Brackenbury, W. J. (2013). Membrane potential and cancer progression. *Frontiers in Physiology*, 4 JUL(July), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00185>