



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

Estudio biofísico/farmacológico del canal de potasio asociado a
tumores cancerosos en humanos Kv10.1

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
TERESA ANTONIA MELÉNDEZ VICTORIA

DIRECTOR DE TESIS:
DR. FROYLÁN MIGUEL GÓMEZ LAGUNAS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR
DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

DR. JUAN PABLO PARDO VÁZQUEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Índice

Índice de abreviaturas.....	iii
Agradecimientos	viii
Resumen	xi
Abstract	xii
1. Introducción	1
1.1. Generalidades	1
1.1.1. Canales de la familia Eag	2
1.1.2. Estructura de los canales eag1	3
1.2. Características funcionales del canal Kv10.1	7
1.2.1. Corriente de potasio a través del canal Kv10.1	7
1.2.2. Corrimiento Cole-Moore	8
1.2.3. Antecedentes directos del trabajo	10
1.3. Papel del canal Kv10.1 en el cáncer	13
2. Objetivo	18
3. Hipótesis	18
4. Metodología	19
4.1. Cultivo celular	19
4.2. Registros electrofisiológicos	19
4.2.1. Soluciones	19
4.2.2. Fármacos	19
4.3. Experimentos electrofisiológicos	20
4.3.1. Protocolos de pulsos de voltaje	20
4.3.2. Competencia Cornish-Bowden	20
4.3.3. Análisis de datos	22
5. Resultados	24
5.1. Efecto de la Dronedaron sobre la corriente de potasio	24
5.2. Efecto de la Dronedaron sobre el corrimiento Cole-Moore	35
5.3. Prueba de competencia entre la Dronedaron y la Amiodaron	37
6. Discusión	40

6.1.	Efecto de la Dronedaronona sobre la corriente de potasio	40
6.2.	Diferencias entre las moléculas Dronedaronona y Amiodaronona	42
6.3.	Interacción de la Dronedaronona con otros canales	43
7.	Conclusión	45
8.	Bibliografía	46

Índice de Abreviaturas

Å	Ångström (1 Å = 1 X 10 ⁻¹⁰ m)
Ad	Amiodarona
ATP	Trifosfato de adenosina
BrdU	5-bromodesoxiuridina
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CaM	Calmodulina
cDNA	ADN complementario
Células CHO	Células derivadas de ovario de hámster chino
Células HeLa	Línea de cultivo celular inmortal (cáncer de cuello de útero)
Células Hek	Células embrionarias humanas de riñón o <i>Human Embryonic Kidney</i>
Células Hek- Kv10.1	Células Hek-293 con expresión estable del canal de potasio Kv10.1
Células MCF-7	Línea de cultivo celular de cáncer de mama
Células NIH 3T3	Líneas celulares de fibroblastos embrionarios de ratón Swiss NIH
Células SHSY-5Y	Sublínea celular de neuroblastoma
CNBHD	Dominio homólogo de unión a nucleótidos cíclicos
CNG	Canales de unión a nucleótidos cíclicos
Cryo-EM	Criomicroscopía electrónica
Cs ⁺	Cesio
C-terminal	Extremo carboxilo terminal
d	Distancia eléctrica
D299	Ácido aspártico en la posición 299 del canal Kv10.1

D264	Ácido aspártico en la posición 264 del canal Kv10.1
Dd	Dronedarona
DMSO	Dimetil sulfóxido
eag	<i>ether à go-go</i>
EGTA	Ácido egtazico o <i>Ethylene Glycol Tetraacetic Acid</i>
elk	<i>eag-like</i> (Kv12)
erg	<i>eag-related</i> (Kv11)
F261	Fenilalanina en la posición 261 del canal Kv10.1
F468	Fenilalanina en la posición 468 del canal Kv10.1
H ⁺	Protón
HCN	Canales modulados por nucleótidos cíclicos activados por hiperpolarización
hEag1	Canal de potasio Kv10.1 de humano
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-iletanosulfónico
HP	Potencial de mantenimiento o potencial de reposo
Hz	Hercio o Hertz
I _K	Corriente de potasio
IV	Curva corriente - voltaje
K ⁺	Potasio
K	Lisina
KCl	Cloruro de potasio
KCNH1	Gen del canal de potasio Kv10.1
K _d	Constante de equilibrio
KF	Fluoruro de potasio

KOH	Hidróxido de potasio
Kv	Canales de potasio activados por voltaje
Kv10.1	Canales de potasio eag (Kv10.1)
L701	Leucina en la posición 701 del canal Kv10.1
Li ⁺	Litio
Mb	Mibefradil
Medio DMEM-F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium - Nutrient Mixture F-12</i>
Mg ²⁺	Magnesio
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
μM	Micromolar
μs	Microsegundo
mM	Milimolar
ms	Milisegundos
mV	Milivolts
N388	Asparagina en la posición 388 del canal Kv10.1
N406	Asparagina en la posición 406 del canal Kv10.1
Na ⁺	Sodio
nA	Nano-ampere
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
n _H	Número de Hill
NH ₄ ⁺	Amonio
N-terminal	Extremo amino-terminal

PAS	Dominio citoplásmico Per-Arnt-Sim
PD	Domino del poro
pH	Potencial de hidrógeno
Q476	Glutamina en la posición 476 del canal Kv10.1
Qd	Quinidina
R	Arginina
Rb ⁺	Rubidio
rEag1	Canal de potasio eag de rata
rKv1.4	Canal de potasio Kv1.4 de rata
S	Segmento transmembrana
S1-S6	Segmentos transmembrana del 1 al 6
SFB	Suero bovino fetal
SCID	Inmunodeficiencia combinada severa
T472	Treonina en la posición 472 del canal Kv10.1
TBS	Síndrome Temple-Baraitser
V _m	Voltaje membranar
VSD	Domino sensor de voltaje, por sus siglas en inglés
WT	Silvestre
Y699	Tirosina en la posición 699 del canal Kv10.1
ZLS	Síndrome Zimmermann-Laband

AGRADECIMIENTOS



Adhaerens potenti adversitatem non timet

Agradezco al Posgrado de Doctorado en Ciencias Biomédicas, así como a la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación que me han brindado estos años, al CONACyT por el apoyo brindado con el número 609446 y por el apoyo económico con el número 45763.

Agradezco hondamente al Dr. Froylán Miguel Gómez Lagunas por su tutoría y enseñanzas estos años y por permitirme participar abiertamente en el Laboratorio de Biofísica de Canales Iónicos, que se encuentra en la Facultad de Medicina, UNAM.

Mi más profundo agradecimiento a la Dra. Carolina Barriga Montoya por su apoyo académico y personal durante mi estancia en el Laboratorio, así como por su amistad e impulso dentro y fuera del Laboratorio a lo largo de mi posgrado.

También agradezco a mi comité tutor integrado por el Dr. Arturo Hernández Cruz y el Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez por el apoyo y asesoría brindados durante mi posgrado.

Así mismo, agradezco a los miembros de mi jurado la Dra. María del Carmen Méndez Herrera, la Dra. Gertrudis Hortensia González Gómez, el Dr. Diego Ricardo Felix Grijalva y el Dr. Luis Manuel Montaña Ramírez por sus observaciones que contribuyeron al mejoramiento de mi tesis.

Y también agradezco al Dr. Diego González Halphen por la guía tan importante que me dio al inicio del posgrado y que me permitió continuar y dar fin a mi doctorado.





Ex toto corde

Sobre todo, quiero agradecer a mi familia, a mis padres y a mis hermanos, por su constante presencia y apoyo incondicional a lo largo de estos años de posgrado, por brindarme el impulso para desarrollarme dentro y fuera de este proyecto de Doctorado.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a Sandra, Nidia, Iván, Violeta, Fabiola y Arturo por su apoyo, recomendaciones académicas y principalmente por la amistad que me han otorgado desde antes del posgrado y durante el desarrollo de este proyecto.



Resumen

En el presente trabajo se llevó a cabo el estudio de la interacción del antiarrítmico Dronedarona con el canal de potasio Kv10.1 (eag1). El canal Kv10.1 es un canal iónico de potasio dependiente de voltaje, el cual presenta la típica conformación tetramérica de los canales de potasio activados por voltaje canónicos, presentando los seis segmentos transmembranales que conforman el dominio sensor de voltaje y el dominio del poro, sin embargo, también presenta tres dominios extras: el dominio PAS, el dominio *C-linker* y el dominio CNBHD; por otro lado, los canales Kv10.1 se encuentra en aproximadamente el 75% de las líneas celulares tumorales y cánceres humanos. La Dronedarona es un antiarrítmico desarrollado a partir del antiarrítmico Amiodarona, que presenta menor toxicidad en el humano en comparación con su predecesora; ambos fármacos son fuertes candidatos para ser reposicionados para tratar el cáncer de ovario. La Dronedarona ocasiona una inhibición de la corriente de potasio del canal Kv10.1 mediante un proceso de bloqueo por poro abierto, sin embargo, no tiene ningún efecto sobre el corrimiento Cole-Moore del canal. Esto último es de suma importancia pues el corrimiento Cole-Moore es una característica específica de los canales Kv10.1, el cual es inhibido por la Amiodarona. Pese a la similitud de los fármacos Dronedarona y Amiodarona las moléculas ejercen efectos diferentes sobre el canal Kv10.1; además, se probó mediante la competencia Cornish-Bowden que interactúan en distintos sitios del canal, dato que es apoyado por la diferencia en la distancia eléctrica de bloqueo de ambas moléculas, siendo $d = 0.16$ para la Dronedarona y $d = 0.5$ para la Amiodarona, sumado a los otros resultados, esto implica que la Amiodarona interactúa tanto en el dominio sensor del voltaje como en el dominio del poro, mientras que la Dronedarona sólo interactúa con el dominio del poro. El estudio farmacológico de los canales Kv10.1 aún tiene mucho por delante, y es indispensable seguir estudiando esta proteína debido a la gran importancia que tiene tanto en la proliferación celular como en otros síndromes neurológicos para así poder desarrollar terapias eficientes en contra de dichos padecimientos, lo cual estará agilizado por las técnicas bioinformáticas de redireccionamiento de fármacos.

Abstract

In this work, the interaction of the antiarrhythmic Dronedarone with the potassium channel Kv10.1 (eag1) was studied. Kv10.1 is a voltage-dependent potassium channel, which presents the typical tetrameric conformation of canonical voltage-activated channels, presenting the six transmembrane segments that make up the voltage sensor domain and the pore domain, however, it also presents three extra domains: the PAS domain, the C-linker domain and the CNBHD domain. On the other hand, Kv10.1 channels are found in approximately 75% of tumor cell lines and human cancers. Dronedarone is an antiarrhythmic drug developed from the antiarrhythmic Amiodarone, which has lower toxicity in humans compared to its predecessor; both drugs are strong candidates to be repositioned to treat ovarian cancer. Dronedarone causes an inhibition of the potassium current of Kv10.1 by an open pore blocking mechanism, however, it has no effect on the Cole-Moore shift. The latter is of utmost importance as the Cole-Moore shift is the specific feature of Kv10.1 channels, and it is inhibited by Amiodarone. Hence, despite the similarity of the drugs Dronedarone and Amiodarone these molecules exert different effects on Kv10.1; in addition to its different effect on the Cole-Moore shift, its blocking effect was tested with the Cornish-Bowden competition, which showed that they interact at different sites in the channel, this data is supported by the difference in the electrical blocking distance of both molecules, $d = 0.16$ for Dronedarone and $d = 0.5$ for Amiodarone. In summary, Amiodarone interacts both in the voltage sensor domain and in the pore domain, while Dronedarone only interacts with the pore domain. Drugs binding in the latter domain occurs at different sites. The pharmacological study of Kv10.1 channels is far from complete, and it is important to continue it.

Estudio biofísico/farmacológico del canal de potasio asociado a tumores cancerosos en humanos Kv10.1

1. Introducción

1.1 Generalidades

Con excepción de los gases y las moléculas hidrofóbicas, sin carga, la mayoría de las moléculas no pueden difundir a través de una bicapa fosfolipídica pura a velocidades suficientes como para satisfacer las necesidades celulares, por lo que el transporte de iones, azúcares, aminoácidos y otros metabolitos son mediados por tres clases de proteínas transmembranales: canales iónicos, bombas impulsadas por ATP y transportadores.

En los canales iónicos el flujo de iones es posible debido a que los canales presentan un poro hidrofílico, y cambian su conformación de proteínas cerradas a abiertas al flujo de iones en respuesta a diferentes estímulos, por ejemplo señales eléctricas (es decir, cambios en el potencial eléctrico de la membrana, V_m), proveyendo un flujo significativo de corriente iónica a través de la membrana donde un único canal es capaz de permear 100,000,000 (1×10^8) iones por segundo (Kandel *et al.*, 1995) a favor del gradiente electroquímico del ion.

Dentro de los canales iónicos, los canales de potasio (selectivos a potasio) constituyen el grupo más numeroso y heterogéneo de proteínas integrales de membrana, se encuentran en bacterias, arqueas y eucariotas; su secuencia de aminoácidos se reconoce porque poseen un segmento altamente conservado (llamado secuencia característica) el cual forma el filtro de selectividad, la región de la proteína que previene el paso de sodio (Na^+) pero permite el paso de potasio (K^+) (Heginbotham, *et al.*, 1994; Doyle *et al.*, 1998). Hay una gran diversidad de canales de potasio, los cuales regulan diversos procesos en las células, tales como: establecer el potencial de reposo, participar en los potenciales marcapasos y regular la excitabilidad de las células, como las neuronas. (Armstrong & Hille 1998).

Los canales de K^+ activados por voltaje (Kv) son tetrámeros, formados por subunidades independientes, cada subunidad consta de seis segmentos transmembranales (S1 - S6), de los cuales S1 a S4 forman el dominio sensor de voltaje (VSD, por sus siglas en inglés) y los segmentos S5, la hélice del poro y S6 forman el dominio del poro (DP). El S4 es el principal componente ya que contiene múltiples residuos cargados positivamente (argininas (R) y/o lisinas (K) separados por dos aminoácidos neutros) lo que le permite sentir el campo eléctrico y moverse en respuesta a cambios del voltaje membranar; el movimiento del S4 está acoplado al DP por un segmento de unión (*linker*) que conecta S4 a S5 (*linker* S4-S5) (Catterall, 2010).

En estructuras conocidas de canales de potasio canónicos (tipo *Shaker*), así como también en estructuras de canales dependientes de voltaje de sodio y calcio, el *linker* S4-S5 es una alfa-hélice que corre paralela a la membrana y se posiciona encima del S6 de la siguiente subunidad, donde se propone que actúa como una palanca que realiza trabajo mecánico en el S6 para cerrar y abrir la compuerta de activación del canal (Armstrong, 1971) cuando el segmento S4 se desplaza hacia el medio extracelular en respuesta a un cambio en el campo eléctrico transmembrana (Long *et al.*, 2005; Long *et al.*, 2007).

1.1.1. Canales de la familia Eag

En 1969 Kaplan y Trout produjeron varias mutantes de la mosca de fruta *Drosophila melanogaster*, siguiendo un tratamiento con etilmetanosulfonato en moscas adultas machos, algunas de las moscas mutantes presentaban un fenotipo de agitación de extremidades (*leg-shaking*) en presencia de éter. Una de esas mutantes exhibía un desarrollo lento y rítmico de temblor en las patas y por ello el locus involucrado fue llamado *ether à go-go* (*eag*) (Warmke & Ganetzky, 1994).

Evidencias posteriores incluyeron la observación de que la mutación *eag* presentaba altas frecuencias de potenciales de acción en motoneuronas, sugiriendo que *eag* podría codificar una proteína involucrada en mantener la estabilidad del potencial de reposo, principalmente un canal de potasio, lo cual fue demostrado en 1993 (Warmke & Ganetzky, 1994); estudios posteriores de homología ayudaron a identificar otras dos secuencias relacionadas a *eag*, con las que posee un alto grado de similitud (Warmke & Ganetzky, 1994): el gen *eag-related* (*erg*, Kv11) y el gen *eag-like* (*elk*, Kv12) (Fig. 1; Bauer & Schwarz, 2018).

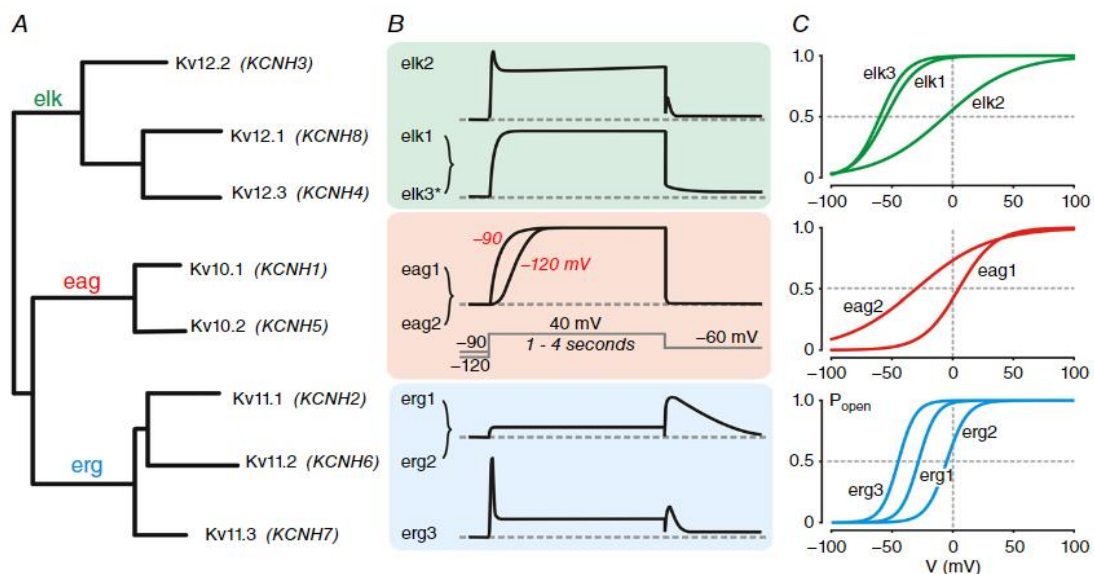


Figura 1. Canales de la familia Eag. A) árbol filogenético de la superfamilia Eag; entre paréntesis se encuentra el nombre del gen que codifica al respectivo canal. B) corrientes características de los canales eag, erg y elk. C) esquemas de las curvas de activación de los canales eag, erg y elk (Tomado de Bauer & Schwarz, 2018).

El genoma humano tiene dos miembros de la familia Eag: Eag1 (1q32.1-2) (Occhiodoro *et al.*, 1998; Pardo *et al.*, 2005) y Eag2 (14q24.3) (Ju & Wray, 2006; Pardo *et al.*, 2005). Ambas proteínas forman canales funcionales en sistemas de expresión heterólogos y ambos canales presentan corrientes que se activan lentamente y sin inactivación; sin embargo, pese a que ambos son abundantes y están ampliamente distribuidos en el cerebro, el patrón y nivel de expresión de ambos es diferente:

Eag1: primeras etapas de diferenciación de mioblastos, placenta (Occhiodoro *et al.*, 1998; Pardo *et al.*, 1999) y principalmente en el cerebro donde se localiza en las terminales presinápticas y regula la liberación de neurotransmisores (Mortensen *et al.*, 2015), también participa en la regulación de la progresión del ciclo celular (Pardo *et al.*, 1998). Su expresión ectópica (fuera del sistema nervioso) está relacionada con procesos oncogénicos (Pardo *et al.*, 1999; Hemmerlein *et al.*, 2016).

Eag2: se encuentra en muchos órganos, como corazón y pulmón, pero es más abundante en el cerebro y músculo esquelético (Ju & Wray, 2006; Pardo *et al.*, 2005).

Electrofisiológicamente es posible discriminar a los canales eag1 y eag2 debido a que los canales eag2 presentan una activación más lenta, una dependencia de voltaje menor y también son significativamente menos sensibles a la quinidina en relación a los canales eag1 (Schönherr *et al.*, 2002).

1.1.2. Estructura de los canales eag1

Los canales eag comparten características que les permiten formar parte de los canales de potasio activados por voltaje, pues son altamente selectivos al K⁺ sobre el Na⁺, estructuralmente son tetrámeros, cada uno tiene seis segmentos transmembranales (S1 a S6); los segmentos S1 a S4 forman el dominio sensor de voltaje, y los segmentos S5, la hélice del poro y S6 forman el dominio del poro, análogo a los encontrados en la familia de canales de K⁺ activados por voltaje tipo *Shaker* (Warmke & Ganetzky, 1994). Sin embargo, la estructura de Kv10.1 se aparta de la arquetípica de canales de K⁺ activados por voltaje (canales Kv), pues presenta propiedades estructurales y funcionales que difieren significativamente de las propiedades de Kv canónicos (tipo *Shaker*):

- a) El vestíbulo externo del poro presenta alfa-hélices de 40 aminoácidos que se extienden ~25Å fuera de la membrana y que rodea la apertura extracelular del poro, lo que estorba la unión de toxinas peptídicas que bloquean a canales Kv canónicos (Figura 2); las alfa-hélices poseen dos sitios de glicosilación (N388 y N406) (Whicher & Mackinnon, 2016), interesantemente, la glicosilación apropiada de uno de los residuos (N406) es requerida para el procesamiento correcto de la proteína y para la función del canal maduro (Pardo *et al.*, 2005).

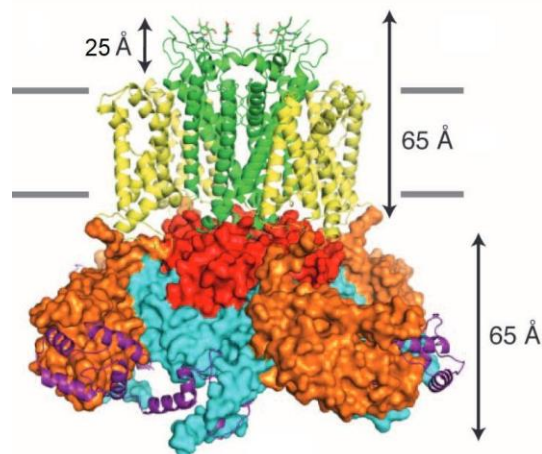


Figura 2. Criomicroscopía electrónica (Cryo-EM) del canal de potasio rEag1. Se observa el PD (verde), el VSD (amarillo), el dominio PAS (naranja), el dominio CNBHD (cian), el c-linker (rojo) y la molécula calmodulina (morado) usada para la obtención del cristal. Resolución general: 3.78 Å; la resolución local para S1, S2, S4-S6, C-linker y CNBHD es entre 3.3 y 4 Å (Tomado de Whicher & Mackinnon, 2016).

- b)* El poro no presenta la cavidad central conspicua por debajo del filtro de selectividad de canales canónicos de K^+ , en su lugar presenta un diámetro de sólo ~ 1 Å entre las superficies de van der Waals, menor que el tamaño de un potasio hidratado (6 - 8 Å) (Fig. 3; Whicher & Mackinnon, 2016).

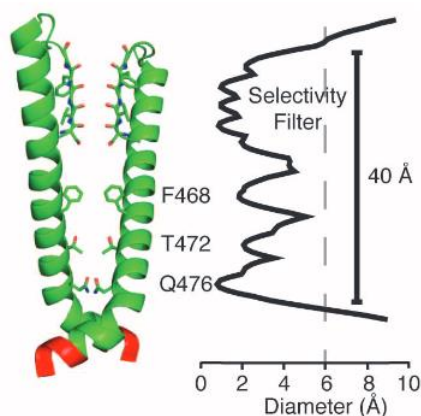


Figura 3. Dominio del poro del canal Kv10.1. Se observa el filtro de selectividad (436 - 441), los sitios de constricción (F468 y T472) y el cruce de las hélices (Q476); a la derecha se observa el diámetro a lo largo del poro, donde se aprecia que en todos los puntos es menor al diámetro de un ion potasio hidratado (6 Å, línea discontinua) (Tomado de Whicher & Mackinnon, 2016).

- c)* El canal Kv10.1 posee un *linker* S4-S5 corto de 5 residuos y que interactúa con el S6 de la misma subunidad, mientras que en Kv canónicos el *linker* es de 15 residuos e interactúa con la subunidad vecina (Fig. 4; Whicher & Mackinnon, 2016); el *linker* S4-S5 es la unión estructural entre el VSD y el PD. Sin embargo, aún en ausencia del *linker* Kv10.1 presenta un mecanismo de apertura y cierre del canal (*gating*) dependiente de

voltaje (Lörinczi *et al.*, 2015).

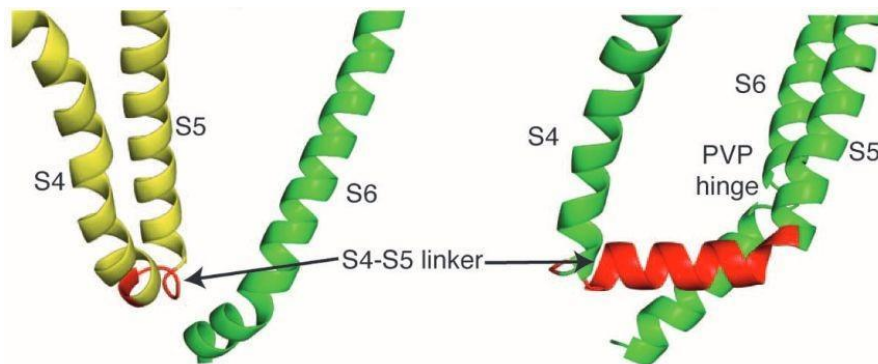


Figura 4. Segmentos transmembranales S4, S5 y S6 y *loop* de la unión de S4 - S5 (rojo) en los canales Kv10.1 (izquierda) y en la quimera Kv1.2-2.1 (derecha) (Tomado de Whicher & Mackinnon, 2016).

d) El extremo C-terminal citoplasmático posee dos dominios: el C-linker y el dominio homólogo de unión a nucleótidos cíclicos (CNBHD, por sus siglas en inglés); el C-linker (Fig. 5, rojo) consta de cuatro hélices, de las cuales las dos primeras interactúan con las segundas dos hélices de la subunidad vecina formando un anillo intracelular directamente arriba del anillo CNBHD (Whicher & MacKinnon, 2016)

El dominio CNBHD (Fig. 5, cian) presenta un alto grado de similitud con los dominios de unión a nucleótidos cíclicos de los canales CNG (*cyclic nucleotide-gated*) y de los canales HCN (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-modulated*) (Carlson *et al.*, 2013); sin embargo, Kv10.1 no responde a nucleótidos cíclicos debido a que, en la estructura tridimensional, una porción de la secuencia ocupa el sitio de unión a nucleótidos cíclicos previniendo su unión (Whicher & MacKinnon, 2016).

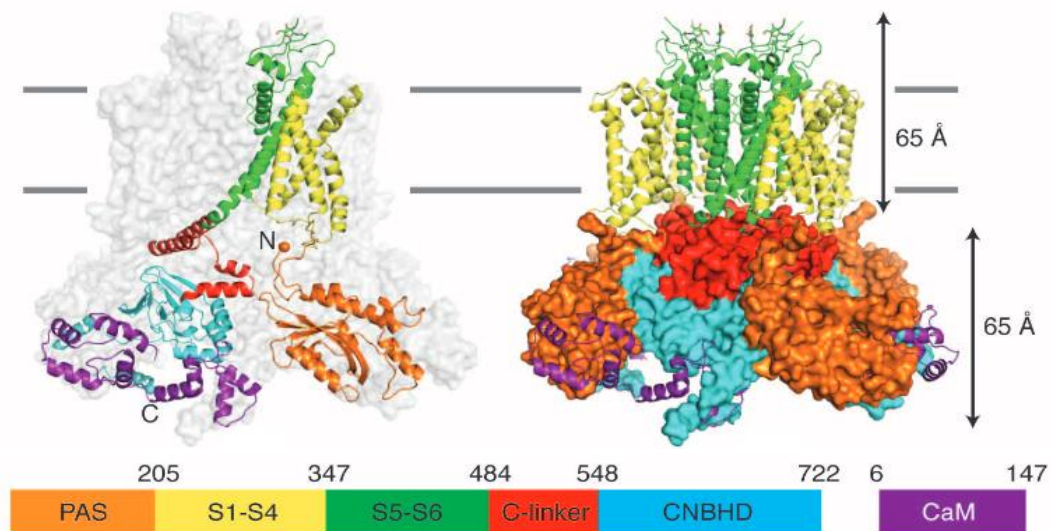


Figura 5. Modelo del canal rEag1 unido a Calmodulina (CaM). Cada dominio está coloreado como se indica en la barra de colores debajo de los modelos, en gris se muestran las líneas que representan a la membrana celular (Tomado de Whicher & Mackinnon, 2016).

e) Kv10.1 tiene un dominio citoplásmico Per-Arnt-Sim (PAS) en el extremo N-terminal de la proteína (Fig. 5 naranja). En general, los dominios PAS se encuentran en proteínas que participan en respuestas celulares a estímulos ambientales, unen diversos ligandos y participan en interacciones proteína-proteína (McIntosh *et al.*, 2010); en Kv10.1 interacciona con el segmento S4 (Whicher & MacKinnon, 2016); el dominio PAS debe su nombre a la letra inicial de tres proteínas donde inicialmente se localizó (Henry & Crosson, 2011):

- Per.- proteínas del periodo circadiano.
- Arnt.- proteína translocadora del receptor nuclear Ah de vertebrados (*aryl hydrocarbon nuclear translocator* (ARNT)).
- Sim.- proteínas *single-minded* que regulan el desarrollo del sistema nervioso central de *Drosophila*.

En Eag1, el dominio PAS está localizado en la periferia de la región intracelular, donde interactúa principalmente con el dominio CNBHD de la subunidad vecina y está posicionado directamente debajo del VSD (Fig. 6; Whicher & MacKinnon, 2016).

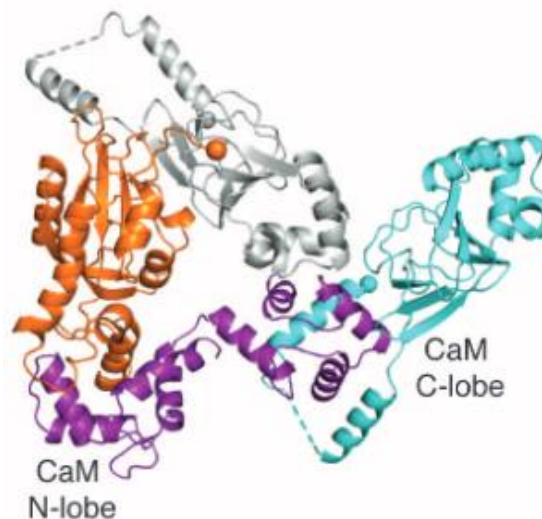


Figura 6. Interacción del dominio PAS. Se observa al dominio CNBHD (cian) “sujetando” a la calmodulina (CaM, morado), la cual a su vez es “sujeta” por una hélice del dominio PAS (naranja) que está, además, interactuando con el CNBHD vecino (gris) (Tomado de Whicher & Mackinnon, 2016).

f) El segmento S4 es una hélice 3_{10} que contiene seis residuos cargados positivamente (K327, R330, R333, R336, R339, K340); además, los residuos F261 y D264 del S2 y D299 del S3 forman el centro de transferencia de carga que facilita el movimiento, en respuesta a cambios en el voltaje membranar, de los residuos cargados positivamente del S4 (Fig. 7; Whicher & MacKinnon, 2016).

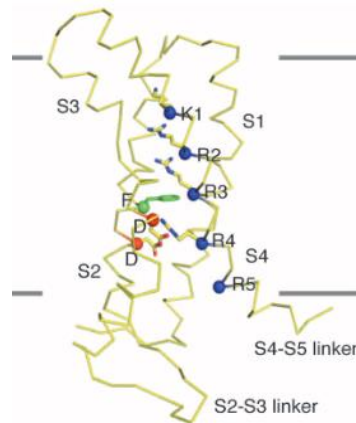


Figura 7. Residuos positivos del S4 (azul), se observan los residuos F261 (verde) y D264 del S2 y D299 (rojo) del S3 que forman un centro de transferencia de carga del canal Eag1 (Tomado de Whicher & Mackinnon, 2016).

1.2. Características funcionales del canal Kv10.1

Los canales Kv10.1 o eag1 presentan corrientes dependientes de voltaje que no inactivan y son altamente selectivos a iones K^+ sobre los iones Na^+ ; además, presentan un característico corrimiento Cole-Moore característico, el cual les permite diferenciarse electrofisiológicamente con facilidad del resto de canales activados por voltaje (Ganetzky *et al.*, 1999). Los canales eag no son muy permeables a Na^+ o Li^+ , pero de manera similar a los canales *Shab* son permeables a Cs^+ ; la secuencia de permeabilidades es: $K^+ > Rb^+ > NH_4^+ > Cs^+ \gg Na^+ > Li^+$, que corresponde a la secuencia de selectividad típica de canales de K^+ , y su cinética es sensible a iones divalentes y a protones (H^+) (Brüggemann, *et al.*, 1993).

1.2.1. Corriente de potasio a través del canal Kv10.1

El canal silvestre expresado en ovocitos de rana *Xenopus laevis* presenta corrientes que se activan alrededor de -50 mV, el tiempo requerido para alcanzar el 80% del nivel de la corriente (t_{80}) con una despolarización de $+20$ mV desde un potencial de mantenimiento de -140 mV es 56 ± 5 ms (Fig. 8; Terlau *et al.*, 1997).

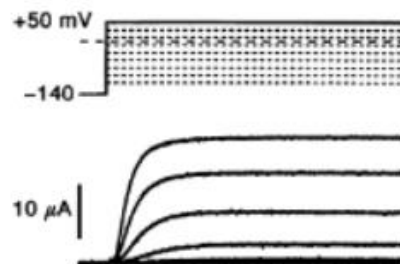


Figura 8. Familia de corrientes de potasio de canales Eag. Corrientes en canales WT (silvestres) expresados en ovocitos de rana, arriba se observa el protocolo que se usó para evocar las corrientes (Tomado de Terlau *et al.*, 1997).

Debido a las características estructurales del canal Kv10.1 se ha buscado saber si los dominios PAS y CNBHD participan en el *gating* del canal, y para ello se han estudiado mutaciones y deleciones de estos dominios.

El N-terminal del dominio PAS afecta la velocidad de activación y desactivación dependiente de voltaje; por ejemplo, se sabe que las deleciones $\Delta 2-190$ y $\Delta 7-12$ en el N-terminal del canal rEag cambian el umbral de activación a potenciales más negativos y enlentecen la cinética de activación (Terlau *et al.*, 1997); así mismo, se sabe que una mutación en la histidina 343 (H343R), un residuo altamente conservado en el C-terminal del S4, compensa los efectos de la cinética inducidos por $\Delta 7-12$ (Terlau *et al.*, 1997).

Por otro lado, el dominio CNBHD, que se localiza en el C-terminal del canal, también participa en la modulación de la corriente de potasio (I_K) y el corrimiento Cole-Moore; a partir de experimentos con canales mutantes se ha propuesto que dicho dominio desempeña un papel en la activación dependiente de voltaje del canal Kv10.1 (Zhao *et al.*, 2017), y se ha observado que mutaciones conjuntas de los residuos Y699 y L701 por alaninas, glicinas o serinas disminuyen la activación del canal Kv10.1 (Zhao *et al.*, 2017).

1.2.2. Corrimiento Cole-Moore

La principal característica electrofisiológica de los canales Eag es una fuerte dependencia, de su cinética de activación, del potencial de mantenimiento. En general, para todos los canales iónicos canónicos activados por voltaje, la corriente presentará un retraso en su activación conforme los potenciales de mantenimiento sean más negativos pero conservando la misma cinética, este fenómeno es llamado corrimiento Cole-Moore (Cole & Moore, 1960), y el corrimiento suele ser de menos de un milisegundo (Pardo *et al.*, 2005).

Por otro lado, en el caso del canal Kv10.1, al igual que los canales canónicos, la velocidad de la activación depende del potencial de mantenimiento desde el cual se activan, de tal forma que cuando el canal se activa desde un potencial de mantenimiento positivo la cinética de activación es varias veces más rápida que cuando el potencial de mantenimiento es más negativo, el cual se encuentra en el orden de decenas de milisegundos (Pardo *et al.*, 2005); sin embargo, en los canales Eag el retraso del movimiento Cole-Moore se debe no sólo al retardo temporal de la activación de la I_K , sino que también se debe a un paso limitante de velocidad (*rate-limiting*) en el movimiento del sensor de voltaje, entre los estados cerrados alejados y los estados cerrados cercanos al estado abierto, que da a la I_K evocada desde potenciales hiperpolarizantes una cinética sigmoidal lenta y muy marcada (Fig. 9. Bauer & Schwarz, 2001; Silverman *et al.*, 2003).

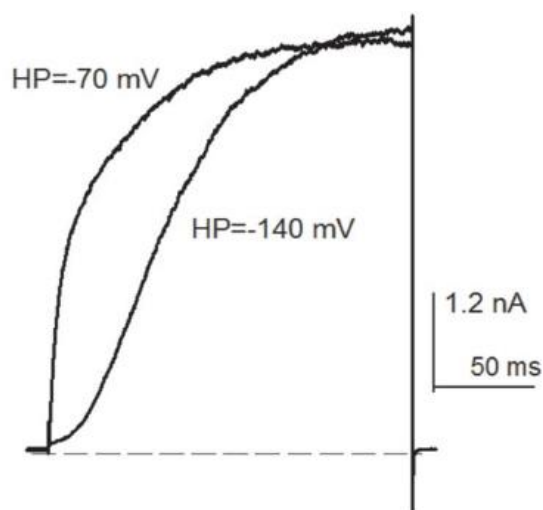


Figura 9. Corrimiento Cole-Moore del canal Kv10.1. Se observan dos corrientes de potasio desde distintos potenciales de mantenimiento (HP), a -70 mV y a -140 mV, en el último se puede apreciar la sigmoidicidad característica de las corrientes de potasio de canales Kv10.1 observada ante potenciales de reposo muy negativos (Tomado de Barriga-Montoya & Gómez-Lagunas, 2017).

Las propiedades del corrimiento Cole-Moore del canal Kv10.1 permiten identificar la expresión funcional de los canales Eag en células y sistemas de expresión ectópicos, siendo diferencial para su identificación eficaz (Pardo *et al.*, 2005).

El corrimiento Cole-Moore del canal Kv10.1 adicionalmente depende del N-terminal, pues se sabe que deleciones del N-terminal lo modifican (Terlau *et al.*, 1996). Registros de corriente indican que el efecto del corrimiento Cole-Moore del canal *WT* es marcadamente reducido en r-eag $\Delta 7-12$ (Fig. 10; Terlau *et al.*, 1997).

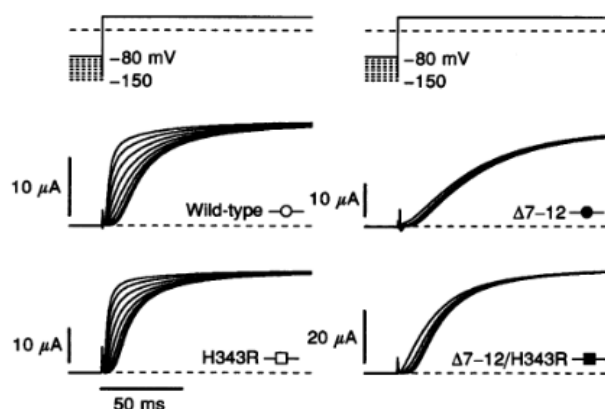


Figura 10. Corrimiento Cole-Moore del canal Kv10.1. Se observan las cinéticas de activación de los canales: canal WT, canal $\Delta 7-12$, canal con la mutación puntual del residuo H343R y de la construcción génica con las dos modificaciones anteriores (Tomado de Terlau *et al.*, 1997).

De forma característica el corrimiento Cole-Moore de los canales Eag es sensible a iones divalentes y a protones (H^+). El movimiento Cole-Moore es más marcado en la presencia de concentraciones elevadas de magnesio (Mg^{2+}) extracelular, dentro del rango fisiológico (Fig. 11; Terlau *et al.*, 1996; Pardo *et al.*, 2005). Las concentraciones extracelulares de Mg^{2+} (así como también de otros iones divalentes) causan un fuerte decremento en la velocidad de activación del canal en una manera dosis- y voltaje-dependiente; bajar el pH externo produce un efecto similar, además, los H^+ parecen competir con el Mg^{2+} por el mismo sitio de unión ya que el Mg^{2+} no enlentece la activación a bajo pH (Ganetzky *et al.*, 1999).

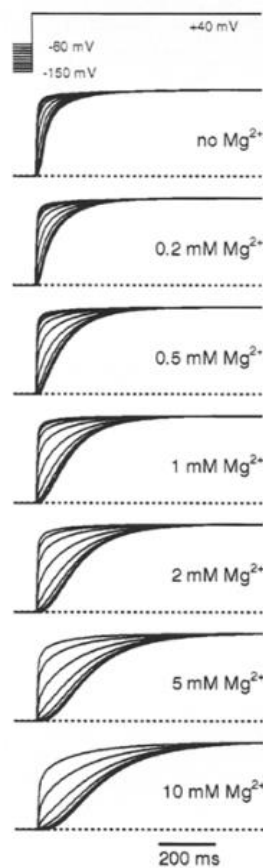


Figura 11. Dependencia de la velocidad de activación de los canales Kv10.1 ante diferentes concentraciones de Mg^{2+} extracelular (Tomado de Terlau *et al.*, 1996).

1.2.3. Antecedentes directos del trabajo.

Los iones divalentes y los H^+ no son los únicos elementos que pueden alterar la corriente de potasio y el corrimiento Cole-Moore. Recientemente se han encontrado fármacos que alteran las características electrofisiológicas del canal Kv10.1.

El antihipertensivo Mibefradil (Mb) y el antiarrítmico Amiodarona (Ad) inhiben la corriente de K^+ (Fig. 12) y el corrimiento Cole-Moore (Fig. 13 y 15), (Gómez-Lagunas *et al.*, 2017a; Gómez-Lagunas *et al.*, 2017b). Esta observación es sorprendente ya que se trata de moléculas con propiedades químicas diferentes, el Mb es soluble en agua hasta una concentración de 30 mM, mientras que la Ad es insoluble en agua. Cabe señalar que estas observaciones constituyen la primera inhibición farmacológica del corrimiento Cole-Moore del canal Kv10.1 que se ha reportado (Fig. 13 y 15).

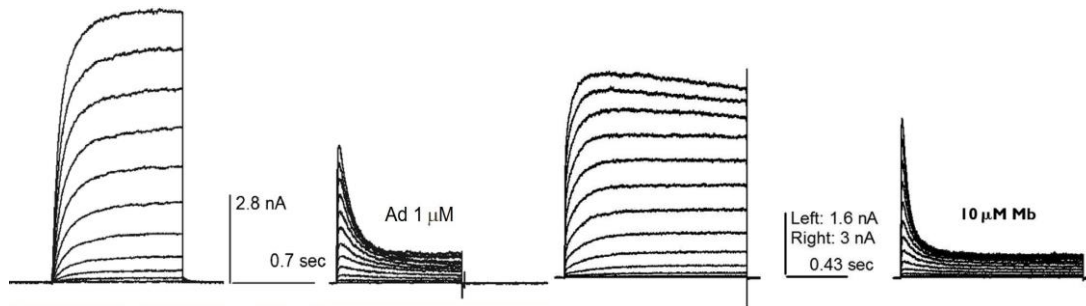


Figura 12. Efectos de los fármacos Amiodarona (1 μ M, izquierda) y Mibefradil (10 μ M, derecha) sobre la corriente de K^+ del canal Kv10.1. (Tomados de Gómez-Lagunas *et al.*, 2017a; Gómez-Lagunas *et al.*, 2017b).

El Mb inhibe la I_K del canal Kv10.1 con una $K_d = 1.4 \mu M$ y, como se mencionó anteriormente, el Mb induce una inactivación aparente de la I_K la cual no es desestabilizada por potasio externo, corre la curva de activación hacia potenciales negativos en una manera dependiente de la concentración y, además, la unión del Mb al canal se lleva a cabo tanto en estados cerrados como en estados abiertos del canal Kv10.1 (Gómez-Lagunas *et al.*, 2017a). Por otro lado, el Mb, contrario a los iones divalentes, acelera el corrimiento Cole-Moore, facilitando la activación y estrechando la corriente hacia el voltaje más positivo (Fig. 13; Gómez-Lagunas *et al.*, 2017a).

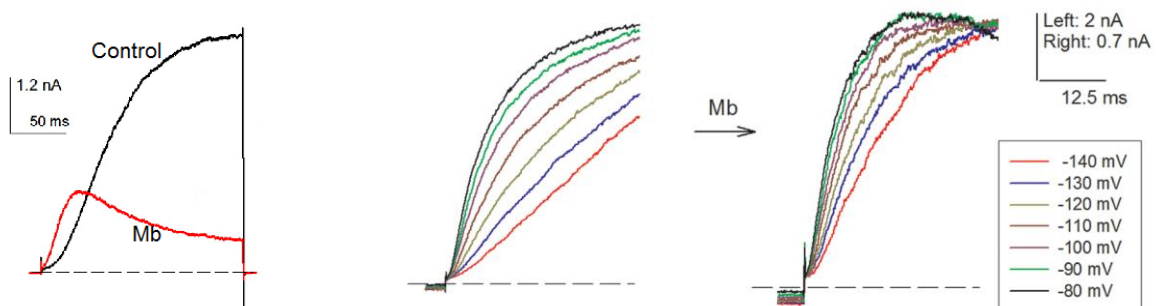


Figura 13. Efecto del Mibefradil (10 μ M) sobre el corrimiento Cole-Moore del canal de potasio Kv10.1. Izquierda, trazos superpuestos donde se aprecia el corrimiento de la corriente ejercida por Mibefradil (rojo) respecto al trazo control (negro) desde un potencial de mantenimiento de -140 mV. Derecha, se observa el estrechamiento de los trazos hacia una activación rápida en presencia de Mibefradil (Tomado de Gómez-Lagunas *et al.*, 2017a).

Además, es importante mencionar que el Mibefradil parece inhibir la I_K sin intervenir en el poro del canal, esto fue sugerido por estudios de competencia entre el Mb y la Quinidina (Qd), la cual es un bloqueador típico del poro, los resultados de la competencia mostraron que la Qd y el Mb inhiben la I_K uniéndose a sitios distintos (Fig. 14; Gómez-Lagunas *et al.*, 2016).

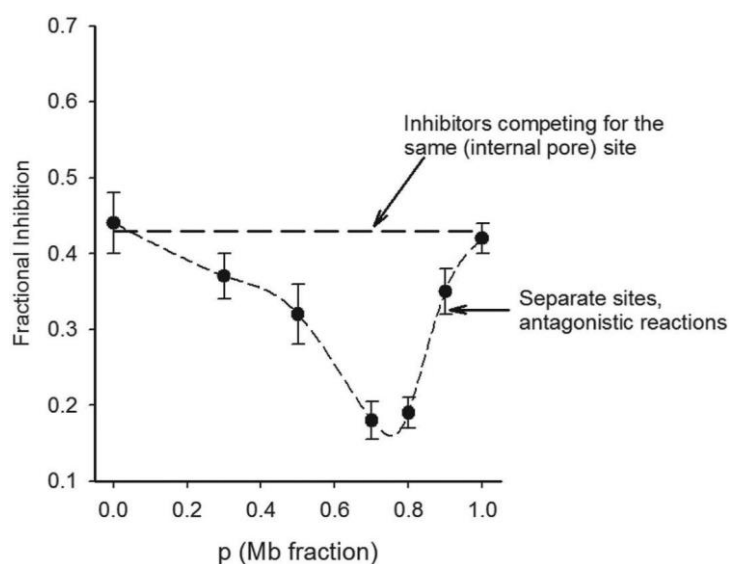


Figura 14. Competencia Cornish-Bowden entre los fármacos Mibefradil y Quinidina, donde $[Qd]=(1-p)*[Qd]_{0.5}$, y $[Mb]=p*[Mb]_{0.5}$, con p entre 0 y 1, y p igual a la concentración relativa de Mb (Tomado de Gómez-Lagunas *et al.*, 2016).

Por otro lado, la Ad interactúa con Kv10.1 a concentraciones nanomolares ($K_d = 203$ nM), significativamente menores a las concentraciones terapéuticas usadas para tratar arritmias (1-3 μ M) (Kodama *et al.*, 1997), lo que convierte a la Ad en un compuesto interesante para potencialmente coadyuvar en contrarrestar el desarrollo de la proliferación celular (Gómez-Lagunas *et al.*, 2017b).

La Ad, al igual que el Mb, ejerce una inactivación aparente sobre la corriente de potasio, sin embargo, la Ad corre la curva de activación hacia potenciales más negativos induciendo un pequeño cambio en la pendiente de la curva e interactúa con el canal Kv10.1 desde estados cerrados del canal sin bloquear directamente al poro (Gómez-Lagunas *et al.*, 2017b). Respecto al corrimiento Cole-Moore, parecido al efecto del Mb, la Ad inhibe el corrimiento Cole-Moore acelerando la activación y llevando los trazos a estrecharse en la respuesta de potenciales más positivos (Fig. 15; Gómez-Lagunas *et al.*, 2017b).

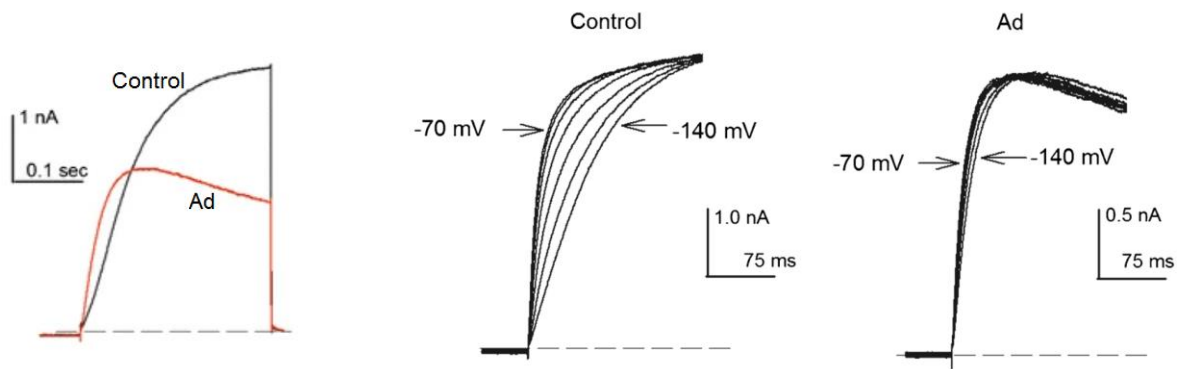


Figura 15. Efecto del fármaco Amiodarona ($1 \mu\text{M}$) sobre el corrimiento Cole-Moore del canal de potasio Kv10.1. Izquierda, trazos superpuestos donde se aprecia el corrimiento de la corriente ejercida por Amiodarona (rojo) respecto al trazo control (negro) desde un potencial de mantenimiento de -140 mV . Derecha, se observa el estrechamiento de los trazos hacia una activación rápida en presencia de Amiodarona (Ad) (Tomado de Gómez-Lagunas *et al.*, 2017b).

1.3. Papel del canal Kv10.1 en el cáncer

Ectópicamente el canal Kv10.1 se expresa en tejidos tumorales de un gran rango de cánceres (Pardo *et al.*, 1999; Hemmerlein *et al.*, 2006), además la sobreexpresión de Eag1 en células de mamíferos induce en estas un fenotipo oncogénico; actualmente se sabe que aproximadamente el 75% de las líneas celulares tumorales y cánceres humanos expresan Kv10.1 (Pardo & Stühmer, 2014). Lo anterior hace que el estudio farmacológico de este canal sea particularmente relevante.

La relación del canal Eag con la proliferación celular fue demostrada por primera vez por el grupo de Pardo y Stühmer, quienes usaron células CHO y células NIH 3T3 silvestres (WT, por sus siglas en inglés) y también transfectadas con canales eag de rata (rEAG) así como con canales Kv1.4, éste último como control para marcar la diferencia entre canales eag y otros Kvs. Los diferentes grupos de células se implantaron en ratas hembra inmunodeficientes (con SCID, *severe combined immunodeficiency*), lo que permitió observar la progresión del crecimiento tumoral; se encontró que, la implantación de células expresando Eag produjo tumores cancerosos, la masa promedio de los tumores inducidos por las células que expresaban al canal hEAG fue significativamente mayor que en los controles (Kv1.4 y células WT) a dos semanas después de la implantación de las células; todos los animales inyectados con hEAG presentaron crecimientos tumorales (Fig. 16; Pardo *et al.*, 1999).

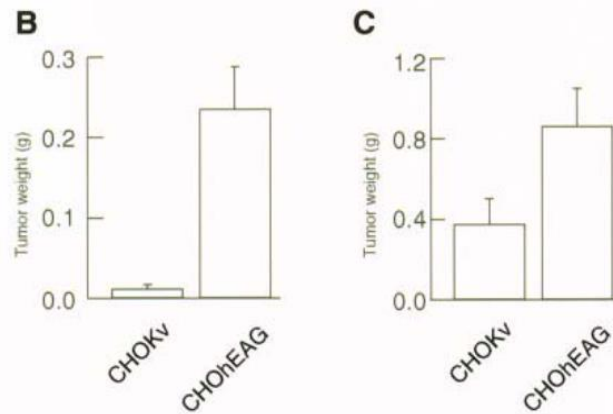


Figura 16. Promedio de la masa tumoral desarrollada con el grupo CHOeEAG y con el grupo CHOv1.4 a las dos (B) y tres semanas (C) después de la implantación de las células (Tomado de Pardo *et al.*, 1999).

Adicionalmente, la actividad metabólica de células con r-EAG fue mucho mayor que la de las células WT (Fig. 17A; Pardo *et al.*, 1999). La medición de las síntesis de ADN mediante la incorporación de 5-bromodesoxiuridina (BrdU), en células sincronizadas en la fase S del ciclo celular, con timidina reveló una actividad metabólica (Fig. 17B) y una tasa de proliferación más rápidas en CHOeEAG, aún en presencia de una baja concentración de suero (Fig. 17C) (Pardo *et al.*, 1999).

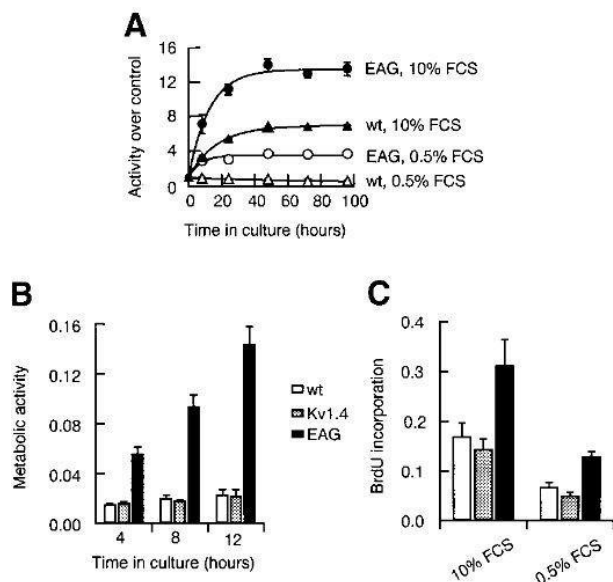


Figura 17. Fenotipo transformado de células CHO transfectadas con r-EAG. A) Curvas de crecimiento de las células CHO transfectadas con rEAG (círculos) comparada con células sin transfección (triángulos). B) Incremento en la actividad metabólica durante las primeras 12 horas después de remover el bloqueo de la fase S. C) Incremento de ADN después de remover el bloqueo de la fase S, para 12 horas de incubación en 10% de SFB (suero bovino fetal) o 24 horas de incubación en 0.5% de FCS (Tomado de Pardo *et al.*, 1999).

Otra indicación de la transformación de las células es la pérdida de inhibición por contacto, la Fig. 18 muestra que células NIH 3T3 transfectadas transitoriamente con el canal rEAG continúan creciendo en racimos, mientras que células WT y células transfectadas con rKv1.4 cesan de crecer una vez cubierta una monocapa homogénea en la caja petri (Pardo *et al.*, 1999).

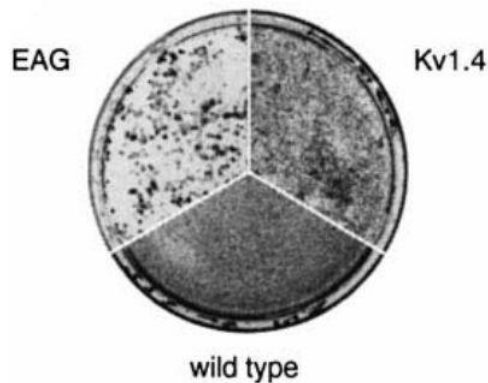


Figura 18. Comparación del patrón de crecimiento de células NIH 3T3 WT y transfectadas con cDNA de rEAG y rKv1.4 (Tomado de Pardo *et al.*, 1999).

Como se mencionó anteriormente, en contraste con su distribución normal restringida a células diferenciadas finales, que ya no se dividen (principalmente neuronas y transitoriamente en mioblastos) se ha encontrado a *eag1* expresado en varias líneas celulares de cánceres humanos incluyendo HeLa, MCF-7 y SHSY-5Y (carcinoma de cérvix, tumor de mama y neuroblastoma, respectivamente), así como también en distintos tipos de cánceres: de ovario, de mama, melanoma, rabdomiosarcoma, linfoma de Burkitt, leucemia linfoblástica aguda y leucemia promielocítica aguda, retinoblastoma y cáncer de colon (Hemmerlein *et al.*, 2006; Camacho, 2006; Rodríguez-Rasgado *et al.*, 2012). Actualmente, se considera al canal *Eag1* como un marcador tumoral (Cuadro 1; Rodríguez-Rasgado *et al.*, 2012).

Cancer Type	Early Biomarker	Prognostic Marker	Tumor Marker	References
Cervical cancer	*		*	[37,42]
Gliomas			*	[38]
Gastric cancer		*	*	[36]
Sarcomas			*	[40]
Ovarian cancer		*	*	[35]
Colon cancer	*	*	*	[39]
Acute myeloid leukemia		*	*	[41]
Breast cancer	*		*	[17]
Lung cancer			*	[17]
Prostate cancer			*	[17]

Cuadro 1. Uso potencial de los canales Eag1 como biomarcadores oncológicos (Tomado de Rodríguez-Rasgado *et al.*, 2012).

Como se puede ver, los canales Kv10.1 (hEag1) son proteínas de sumo interés, así pese a su descubrimiento relativamente reciente pronto se han localizado entre los canales de potasio activados por voltaje más importantes, participando en un sinnúmero de procesos que incluyen la proliferación celular así como algunas enfermedades del sistema nervioso, tales como los síndromes Zimmermann-Laband (ZLS) y Temple-Baraitser (TBS), de los cuales se sabe están vinculados con el gen KCNH1, el cual codifica para el canal Kv10.1. El síndrome ZLS es un trastorno del desarrollo y es caracterizado por dimorfismo facial, ampliación gingival, discapacidad mental, hipoplasia o hiperplasia de las uñas y falanges terminales e hipertriosis; se ha mostrado que mutaciones en el gen KCNH1 causan ZLS (Kortüm *et al.*, 2015). En el caso del síndrome TBS, este es un trastorno del desarrollo multisistémico caracterizado por discapacidad mental y epilepsia e hipoplasia o aplasia de las uñas de los pulgares (Kortüm *et al.*, 2015; Simons *et al.*, 2015). Además, sus particularidades estructurales dan un gran aporte al estudio evolutivo de los canales en general, pues probablemente podrían ser un eslabón evolutivo entre los canales de potasio activados por voltaje y los canales que son modulados por nucleótidos cíclicos.

Por lo anterior, es importante comprender su funcionamiento y ser capaces de modularlo, para así poder usarlo como diana en los diversos padecimientos en los que participa; y dicho sea de paso, en el camino llegar a dar un aporte biofísico importante para el área de estudio de los canales de potasio activados por voltaje.

Para estudiar el canal Kv10.1 decidimos estudiar el efecto del antiarrítmico Dronedarona (Dd). El antiarrítmico Dd se desarrolló para sustituir a la Ad en el tratamiento de la fibrilación auricular no permanente y el aleteo auricular, con el objetivo de reducir los efectos secundarios de esta última. Se disminuyó la toxicidad de la Ad en la tiroides eliminando los dos átomos de yodo, y se redujo su vida media en el cuerpo mediante la reducción de su hidrofobicidad a través de la adición de un grupo metanosulfonato (Santos *et al.*, 2015); así, el tiempo de residencia en plasma es de 4 a 8 días para la Dd y más de dos semanas para la Ad (Adlan &

Lip, 2013).

Electrofisiológicamente, la Ad inhibe la I_K y el corrimiento Cole-Moore del canal Kv10.1, esto con una concentración menor a la usada contra arritmias cardiacas, lo que le confiere un gran valor como posible medicamento contra la proliferación celular, sin embargo, debido a su toxicidad en la tiroides y a su larga permanencia en el cuerpo lo mejor es encontrar o desarrollar otro fármaco que parta de esta y que presente el mismo efecto sobre el canal Kv10.1.

Por lo anterior, se decidió estudiar a la Dd pues, como se mencionó anteriormente, es un derivado de la Ad desarrollado para cumplir el mismo objetivo siendo menos tóxico y requiriendo menor concentración del fármaco contra arritmias, lo que le confiere ventajas farmacológicas sobre la Ad, lo que en principio la hacía ver como un mejor agente en contra de la proliferación celular inducida por Kv10.1; además, dadas las diferencias estructurales entre Ad y Dd el estudio de Dd nos ayudará a comprender la relación de la estructura de los fármacos en su interacción con el canal Kv10.1.

2. Objetivo

Debido a la importancia del canal Kv10.1 en el cáncer se busca determinar la potencia relativa de la Dronedarona tanto en la inhibición de la corriente de potasio, así como suposible efecto sobre el corrimiento Cole-Moore del canal Kv10.1.

Con lo anterior se busca, además, determinar los componentes moleculares de este tipo de sustancias (derivados de Benzofuran) que se requieren para inhibir la corriente de potasio y el corrimiento Cole-Moore el cual tipifica la dependencia del voltaje del canal Kv10.1.

3. Hipótesis

Con base en la similitud de la estructura molecular de la Dronedarona y la Amiodarona, se espera que la Dronedarona presente efectos cualitativamente similares a los de la Amiodarona, particularmente se espera que inhiba tanto la corriente de potasio (I_K) como el corrimiento Cole-Moore.

4. Metodología

4.1. Cultivo celular

Se utilizaron cultivos de células Hek-Kv10.1 (células Hek-293 con expresión estable del canal de potasio Kv10.1) mantenidas en medio DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) adicionado con 10% de SFB (suero bovino fetal), y se usó el antibiótico de selección zeocina ([300 ug/ml]); las células se mantuvieron en una incubadora a 37 °C, en una atmósfera húmeda y con 5%/95% de CO₂/oxígeno; las células se resembraban cada tercer día para lo cual se recuperaban por tripsinización con tripsina-EDTA 0.05 % para inactivar la reacción de la tripsina se usó medio DMEM normal. Los días de registro electrofisiológico las células se recuperaban por tripsinización y se sembraban en pequeños vidrios, después de una hora se usaban para registrar a lo largo del día. Las células Hek-Kv10.1 fueron donadas por los doctores Luis Pardo y Walter Stühmer del Instituto Max Planck, Göttingen, Alemania.

4.2. Registros electrofisiológicos

Los datos electrofisiológicos se obtuvieron con el amplificador HEKA EPC10 Patch Clamp (HEKA instruments), con la técnica de *patch-clamp* mediante el registro de la corriente de potasio total de las células bajo fijación de voltaje, en la modalidad de célula completa (*whole-cell*), para lo cual se usaron electrodos de vidrio de borosilicato (KIMAX51) con una resistencia de ~1-1.5 MΩ.

4.2.1. Soluciones

La solución intracelular contiene, en [mM]: 90 KF, 30 KCl, 2 MgCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES, ajustada a pH 7.2 con KOH.

La solución extracelular contiene, en [mM]: 5 KCl, 2 CaCl₂, 157 NaCl, 10 HEPES, ajustada a pH 7.2 con NaOH.

4.2.2. Fármacos

Se usaron los fármacos Amiodarona (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y su derivado Dronedarona (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

La Amiodarona y la Dronedarona se disolvieron en DMSO (Dimetil sulfóxido, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se almacenaron en stocks en congelación, 1 mM y 10 mM respectivamente. Para realizar los registros electrofisiológicos, un stock se descongelaba previo al registro y se disolvía en la solución extracelular para posteriormente ser aplicada mediante un sistema de perfusión por gravedad. La concentración final de DMSO siempre fue menor a 0.01% (v/v).

4.3. Experimentos electrofisiológicos

4.3.1. Protocolos de pulsos de voltaje

Dependiendo del fenómeno a explorar se usaron diferentes protocolos. Para el estudio de las familias de corriente-voltaje (I-V) de potasio se usaron pulsos de 400 ms de duración con voltajes de -50 a +50 mV aplicados cada 10 mV, en intervalos de 10 segundos, desde un potencial de reposo de -70 mV. Para estudiar el corrimiento Cole-Moore se usó un protocolo de dos pulsos, el primero fue generado con pulsos de 50 ms de duración que iban desde -140 a -70 mV cada 10 mV, el segundo pulso fue un pulso de prueba de +30 mV durante 250 ms, con 10 segundos entre cada par de pulsos desde un potencial de reposo de -140 mV.

Para estudiar el estado estacionario, en presencia de Dronedarona, se usó el protocolo h-infinito para el cual se usó un primer pulso condicionante de 500 ms de duración con voltajes de -80 a +50 mV, aplicados en intervalos de 10 mV y cada 20 segundos, desde un potencial de reposo de -70 mV, posteriormente se aplicaba el pulso de prueba de +50 mV por 50 ms para medir qué fracción de los canales presentaban una inactivación aparente causada por la Dd.

Para determinar la tasa de recuperación de la inactivación aparente causada por la Dd se usó otro protocolo de dos pulsos como sigue: se aplicaron dos pulsos de la misma amplitud (+50 mV) y duración (100 ms), con intervalos de 30 segundos, donde el primero era el pulso condicionante y el segundo el pulso de prueba, entre cada pulso se variaba el tiempo de repolarización en el cual se llevaba el voltaje al potencial de recuperación, de 2.5 ms a 300 ms; este protocolo se usó desde dos potenciales de reposo, a -70 y a -140 mV.

Para explorar el efecto de la concentración de potasio extracelular en el bloqueo de los canales Kv10.1 por la Dd se utilizó un protocolo de corrientes entrantes, que consistió en aplicar un pulso de +10 mV por 100 ms seguido de un pulso repolarizante a -100 mV por 30 ms, desde un potencial de reposo de -70 mV.

Todos los experimentos fueron adquiridos con un muestreo de 50 μ s (20kHz). La capacitancia membranal y la resistencia en serie fueron compensadas con el circuito integrado del amplificador HEKA EPC10 Patch Clamp; la compensación de la resistencia en serie siempre fue mayor a 80%. Todos los protocolos se corrieron en condiciones control y en la presencia de diferentes concentraciones de Dd.

4.3.2. Competencia Cornish-Bowden

Uno de los métodos para estudiar al canal Kv10.1 fue mediante el estudio de la competencia Cornish-Bowden, la cual permite estudiar la interacción de dos compuestos inhibidores a la vez sobre una enzima (proteína), mediante la combinación de sus concentraciones que van variando de la siguiente forma (Chevallard, *et al.*, 1993):

$$[X] = (1-p) * [X]_{0.5}$$

$$[Y] = p * [Y]_{0.5}$$

donde X y Y son dos compuestos diferentes, Amiodarona y Dronedaron para el presente trabajo, p es la proporción de los compuestos que va de 0 a 1 (variando en intervalos de 0.2), y $[X]_{0.5}$ y $[Y]_{0.5}$ representan la concentración de la K_d de cada compuesto; de tal forma que las concentraciones usadas variaron de acuerdo a lo siguiente:

$$((1-p) * 0.203 \mu\text{M Ad}) + (p * 1\mu\text{M Dd})$$

La mezcla de las concentraciones anteriores se agregaba a la cámara de registro, y para los registros se usó un pulso de +20 mV desde un potencial de mantenimiento de -70 mV, durante 500 ms; se midió la amplitud de las corrientes hacia el final del pulso, con lo cual se calculó la fracción inhibida (f_i) de las corrientes mediante la fórmula:

$$f_i = 1 - (I_f / I_c),$$

donde I_f es la corriente de potasio ante la presencia de la mezcla de fármacos y I_c es la corriente de potasio en condiciones control.

La competencia Cornish-Bowden permite diferenciar tres respuestas diferentes, las cuales se interpretan con base en el gráfico resultante, de tal forma que: 1) si la interacción de cada compuesto ocurre en el mismo sitio en la proteína (por ejemplo inhibición mutuamente excluyente) la curva del gráfico no varía a lo largo de p ; 2) si la interacción de cada compuesto ocurre en sitios diferentes y sin interacción entre ellos (por ejemplo interacción independiente y por lo tanto aditiva-sinérgica), se observa un gráfico con un máximo; finalmente, 3) si los compuestos ejercen inhibición cruzada entre ellos (cada compuesto es más efectivo inhibiendo la interacción del otro compuesto con la proteína que reaccionando con la proteína misma), se observa un gráfico con un mínimo e indica que los compuestos son antagonistas (Figura 19; Chevillard, *et al.*, 1993).

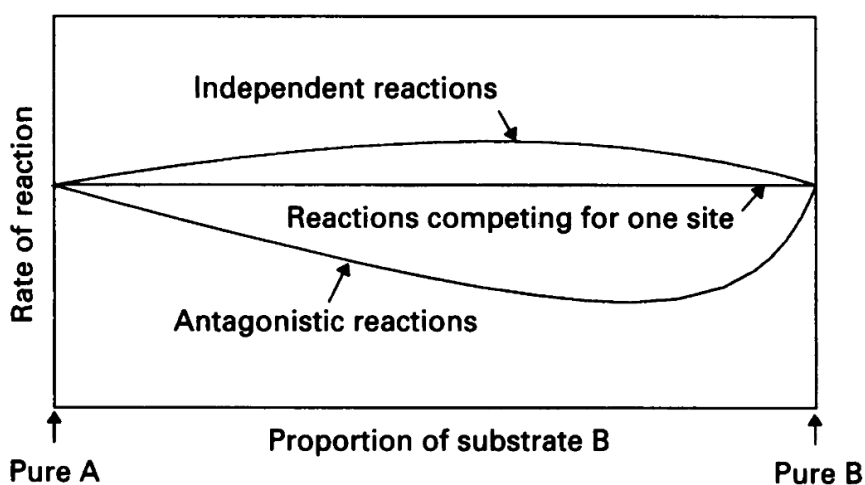


Figura 19. Gráfica de competencia Cornish-Bowden. Dependiendo de la interacción de los compuestos se obtiene un gráfico característico (Tomado de Chevillard, *et al.*, 1993).

4.3.3. Análisis de datos

El corrimiento Cole-Moore se analizó midiendo el $t_{1/2}$, el cual es la mitad del tiempo que le toma a la corriente llegar a su amplitud máxima. Mientras que las corrientes de potasio de las familias I-V se analizaron midiendo la amplitud, en la parte final del trazo, y se calculó la fracción inhibida (f_i) de las corrientes mediante la fórmula:

$$f_i = 1 - (I_{Dd} / I_C),$$

donde I_{Dd} es la corriente de potasio ante la presencia de Dronedarona y I_C es la corriente de potasio en condiciones control.

Para el cálculo de la conductancia cuerda se usó la siguiente ecuación:

$$G(V)/G_{\max} = [I_K(V)/(V-V_{\text{rev}})]/G_{\max},$$

donde I_K es la corriente de potasio, V es el potencial membranal, V_{rev} es el potencial de inversión del potasio, G es la conductancia y G_{\max} es la conductancia máxima.

Para analizar el estado estacionario, o curva h-infinito, se realizó una normalización de la amplitud de la corriente pico evocado por el pulso de prueba en función del pulso condicionante, de forma que:

$$\text{normalización} = I_p / I_{p,\max},$$

donde I_p es el pico de la corriente de potasio en cada pulso de prueba y $I_{p,\max}$ es la amplitud máxima del pico de la corriente de potasio.

La tasa de recuperación de la inactivación aparente (ri) se analizó como sigue:

$$ri = (I_{2p} - I_{1e}) / (I_{1p} - I_{1e}),$$

donde I_{1e} es la corriente medida al final del primer pulso y I_{1p} es el pico de la corriente del primer pulso, I_{2p} es el pico de la corriente evocada por el segundo pulso.

Para los protocolos de corrientes entrantes se analizaron las corrientes salientes y entrantes; en las corrientes de potasio salientes ($I_{K,\text{salientes}}$) se midió la amplitud hacia el final del pulso, mientras que las corrientes de potasio entrantes ($I_{K,\text{entrante}}$) fueron evaluadas mediante el ajuste de una función exponencial:

$$I_{\text{entrante}} = I_o * \exp(-t/T);$$

donde I_o es la corriente de potasio al tiempo cero de repolarización, T es la constante de tiempo y t es el tiempo; los datos fueron usados para calcular la inhibición fraccional.

Para analizar los resultados también se realizaron ajustes con las siguientes ecuaciones:

- Boltzmann:

$$G/G_{\max} = 1 / [1 + \exp((-zF / RT)(V-V_{0.5}))],$$

donde G/G_{\max} es la normalización de la conductancia, z es la carga efectiva del sensor del voltaje, F es la constante de Faraday (96,500 C/mol), R es la constante de los gases (8.314 J/mol*K), T es la temperatura absoluta en grados Kelvin $V_{0.5}$ es el voltaje en el cual se obtiene la mitad de la conductancia máxima y V es el voltaje de prueba.

- Hill

$$Fc = [L]^n / K_{d,app} + [L]^n$$

donde Fc es la fracción de la concentración del fármaco que se une al canal, $K_{d,app}$ es la constante de disociación aparente, L es la concentración del fármaco y n es el coeficiente de Hill.

- Woodhull:

$$K_d(V) = K_o(0) * \exp[-zd(F/RT)*V],$$

donde z es la carga eléctrica neta de la Dronedarona (tomada como +1), K_d es la constante de disociación aparente, K_o es la constante de disociación observada (K_d) a cero mV, d es la llamada distancia eléctrica (esto es, la fracción de la caída del voltaje a través de la membrana en el sitio de unión de la Dronedarona), F es la constante de Faraday (96,500 C/mol), R es la constante universal de los gases (8.314 J/mol*K), T es la temperatura absoluta en grados Kelvin y V es el voltaje de prueba.

Los resultados fueron expresados como \pm SEM (error estándar de la media), se usaron de 5 a 8 experimentos independientes para cada condición. Los datos fueron analizados usando los programas FitMaster, Sigma plot 10 y Excel. El ajuste de los diferentes modelos se comparó mediante la prueba de F (Fisher) de suma de cuadrados extra; el nivel de significancia se fijó en 0.05.

5. Resultados

5.1. Efecto de la Dronedarona sobre la corriente de potasio

La amplitud de las corrientes de potasio disminuye en un $\approx 50\%$, dependiendo del voltaje de prueba, bajo la presencia de $1\mu\text{M}$ de Dd. Las corrientes evocadas con pulsos iguales o mayores a $+20\text{ mV}$, voltaje en el cual los canales se activan rápido, presentaron una inactivación aparente la cual es más evidente en presencia de pulsos más despolarizantes (Figura 20, derecha). En la Figura 21 se presenta la curva corriente-voltaje (IV) de los trazos en la Figura 20, que muestra la diferencia de corriente entre el control (círculos negros) y el grupo con Dd (círculos blancos), observándose que la inhibición por Dd incrementa conforme aumenta el voltaje. Esto demuestra que la inhibición es dependiente del voltaje.

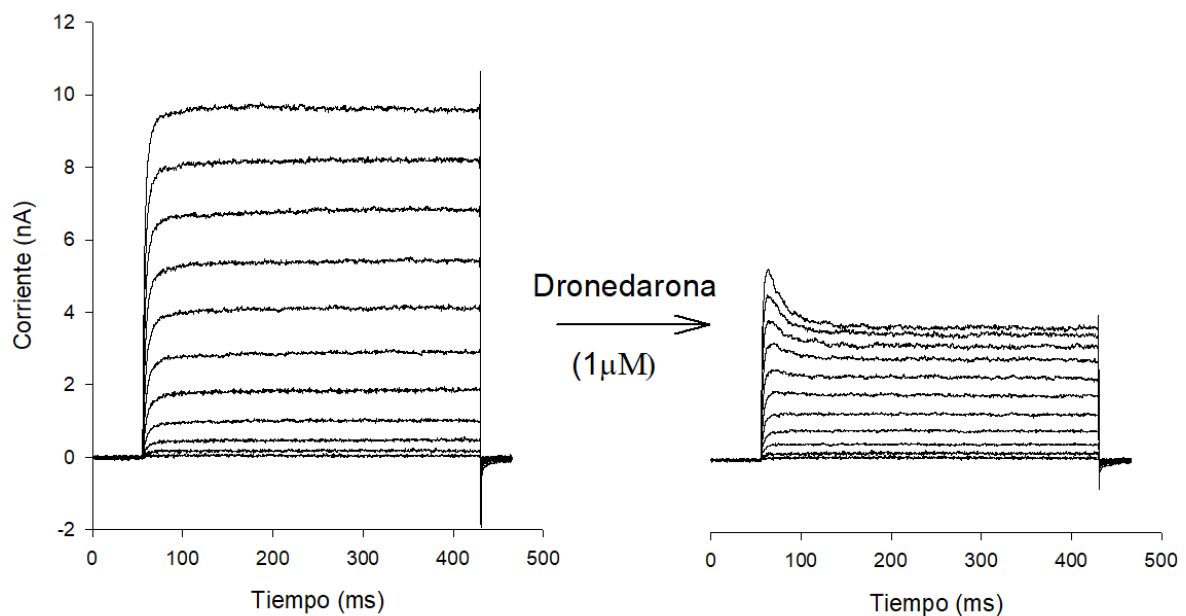


Figura 20. Efectos del fármaco Dronedarona sobre la corriente de K^+ de los canales $\text{Kv}10.1$ en condiciones control (izquierda) y en la presencia de $1\mu\text{M}$ de Dronedarona (derecha).

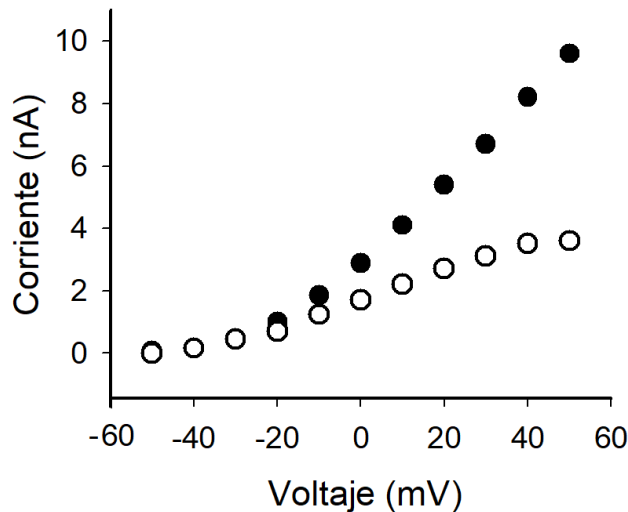


Figura 21. Curva corriente (I)-voltaje (V) de los trazos de la Figura 20 en condiciones control (círculos negros) y en presencia de 1 μ M de Dronedrona (círculos blancos), mediciones realizadas al final del trazo.

Para explorar la afinidad de la interacción entre la Dd y el canal Kv10.1 se realizaron diversos registros de familias de corrientes, como se muestran en la Figura 20 pero con diferentes concentraciones de Dd, y se realizaron gráficas de la inhibición fraccional (f_i) de las corrientes contra la concentración de Dd (f_i vs [Dd]).

En la Figura 22 se presenta el gráfico de inhibición fraccional contra concentración de Dd ([Dd]) en registros realizados con pulsos de +30 mV, la curva es un ajuste con la ecuación de Hill (línea) de la cual se obtuvo una afinidad aparente ($K_{d,app}$) de 0.9 μ M y un número de Hill (n_H) de 0.92, lo que indica que la Dd se une con alta afinidad y con una estequiometría de 1:1 en el canal Kv10.1.

Posteriormente el ajuste de la ecuación de Hill se realizó en curvas de f_i vs [Dd] en los voltajes de +20 a +60 mV (como en la Figura 22), en los cuales la probabilidad de apertura del canal está cerca de la saturación. Posteriormente se graficó la afinidad aparente contra el voltaje correspondiente (Fig. 23), los datos se ajustaron usando la ecuación de Woodhull (línea), con $K_d(0) = 1.1 \mu$ M y distancia eléctrica (d) = 0.16, lo que sugiere que la Dd se une a un sitio localizado en un 16 % de la caída de potencial. La Figura 23 demuestra que, como se había observado en la Figura 21, la afinidad aparente de la Dd incrementa con los voltajes despolarizantes.

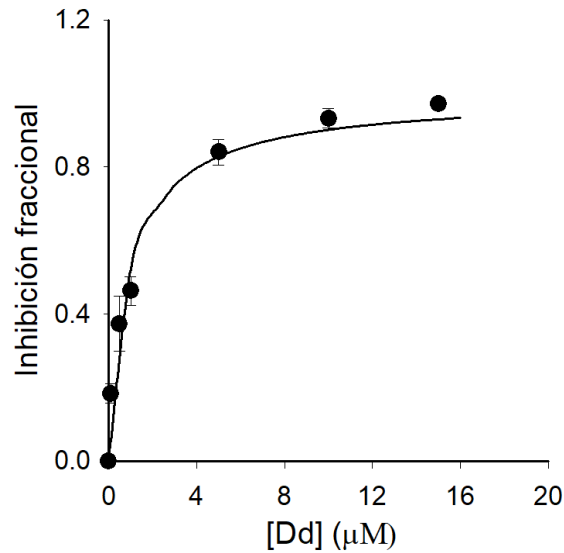


Figura 22. Inhibición fraccional de la corriente de potasio contra la concentración de Dronedaron a +30 mV, se observa el ajuste de Hill (línea) de donde se obtiene que la $K_{d,app} = 0.9 \mu\text{M}$ y el $n_H = 0.92$.

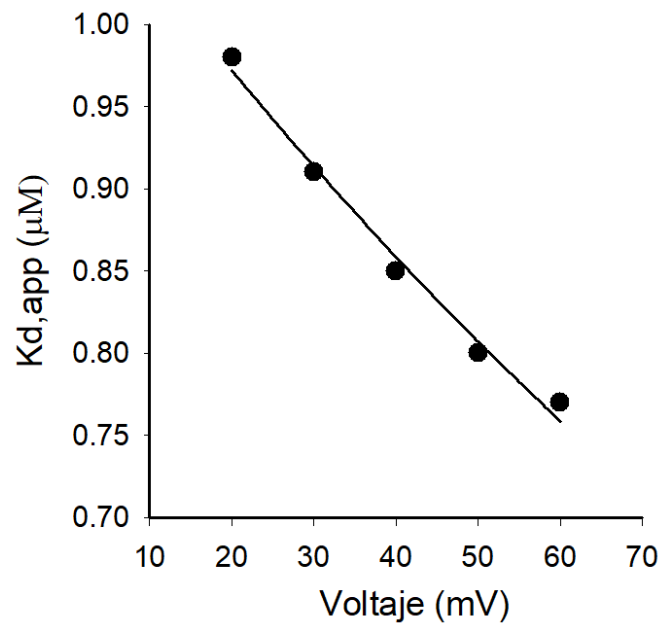


Figura 23. Afinidad aparente de Dronedaron contra voltaje. Obtenida de experimentos como los de la Figura 22 para diferentes voltajes. La curva que cruza los puntos es un ajuste con la ecuación de Woodhull, con $d = 0.16$ y $K_{d(0)} = 1.1 \mu\text{M}$.

Para estudiar la interacción de la Dd en función del estado del canal (abierto vs cerrado) se realizó un estudio de la dependencia del voltaje de la inhibición por Dd en estado estacionario. En esta prueba se mantiene a los canales en un prepulso condicionante el tiempo suficiente para que la inhibición por Dd alcance su estado estacionario, lo cual se mide con un

pulso despolarizante de prueba en el que se evalúa la fracción de canales que no se inhibieron durante el tiempo que se mantuvo el voltaje del prepulso correspondiente.

En la Figura 24 se puede apreciar la corriente en el pulso de prueba cuando el pulso condicionante fue de -60 mV (rojo), el cual es más grande que cuando el pulso condicionante fue de +40 mV (negro); lo que indica que la Dd inhibe con mayor facilidad (probabilidad) a los canales abiertos.

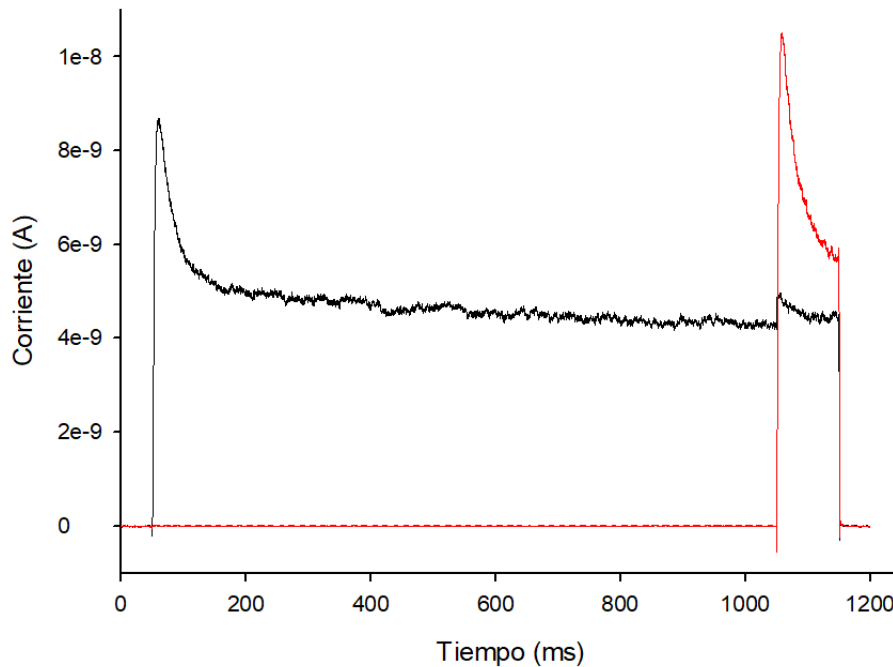


Figura 24. Estudio de la inhibición en estado estacionario. Inhibición de los canales Kv10.1 después del equilibrio con 2 μ M de Dronedarona en dos voltajes condicionantes: -60 mV (rojo) y +40 mV (negro).

Lo anterior sugiere que la Dd interactúa con el canal Kv10.1 mediante un mecanismo de inhibición de poro abierto, pues la corriente en el pulso prueba va disminuyendo conforme el pulso condicionante va aumentando hacia valores donde la probabilidad de apertura es mayor (Fig. 25), lo cual se aprecia mejor al comparar la inhibición de estado estacionario contra la curva de activación (conductancia cuerda), donde se puede observar que la inhibición coincide con la activación de los canales (Fig. 26), de tal manera que conforme el voltaje aumenta la inhibición de la I_K también va incrementando; lo cual apoya la idea de una interacción mediante un mecanismo de poro abierto.

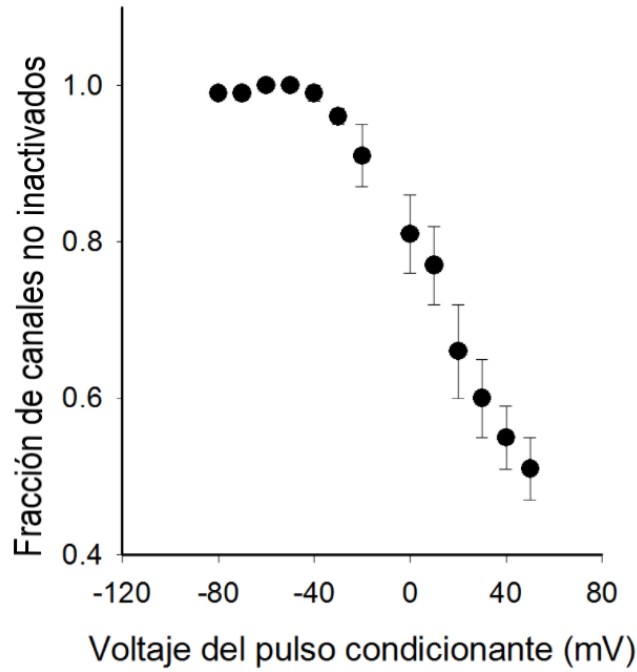


Figura 25. Curva de la fracción de canales no bloqueados como función del pulso condicionante. Para el cálculo de la fracción de canales no bloqueados se siguió I_p/I_{pmax} , donde I_p es el pico de la corriente de potasio en cada pulso de prueba y I_{pmax} es la corriente de potasio máxima que se obtuvo.

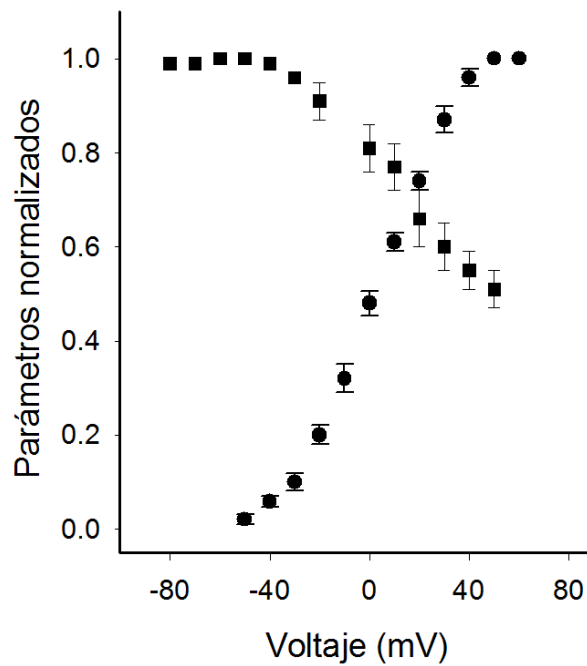


Figura 26. Comparación de la fracción de canales no inactivados (inhibidos, cuadrados), en presencia de 2 μM de Dronedaron, contra la conductancia cuerda en condiciones control (círculos). Se puede observar que la inhibición inicia con la activación de los canales.

En la Figura 27 se puede apreciar la comparación de las curvas de conductancia cuerda en condiciones control y en presencia de $2\mu\text{M}$ de Dd. Se aprecia que la Dd no cambia la curva de activación, o sea que el equilibrio de los canales entre el estado abierto y el estado cerrado no cambia al agregar Dd.

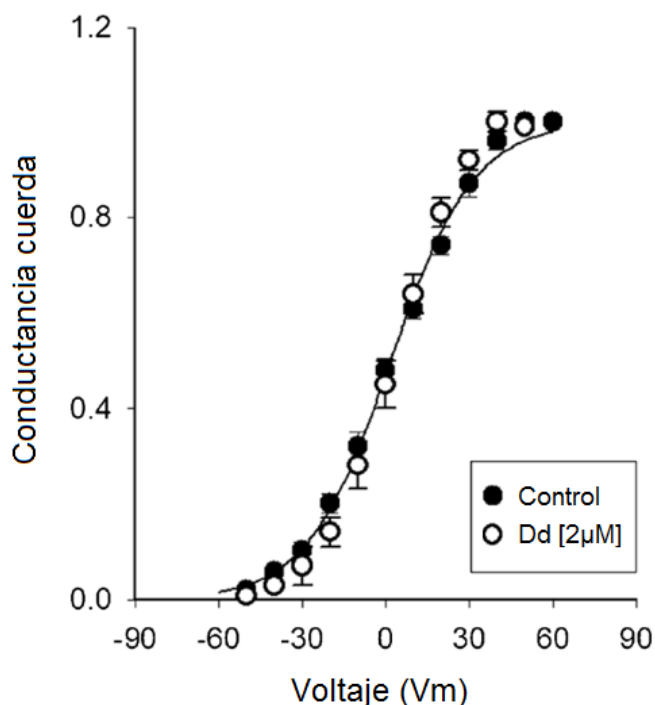


Figura 27. Conductancia de cuerda normalizada en condiciones control (círculos negros) y en presencia de $2\mu\text{M}$ de Dronedarona (círculos blancos) contra voltaje. La línea es un ajuste de la curva control con la función de Boltzmann, con $V_{0.5} = +10\text{ mV}$ y $z = +1.4e$.

Posteriormente se decidió indagar el efecto del potasio sobre la estabilidad de la interacción entre la Dd y el canal Kv10.1; considerando que si la Dd inhibe al canal Kv10.1 bloqueando su poro entonces un incremento en el influjo de potasio pudiera acelerar la salida de Dd del poro del canal, es decir, puede acelerar la recuperación de la inhibición (desinhibición) por Dd (Armstrong, 1971). Para analizar esto se realizaron experimentos típicos de recuperación de la inactivación, en este caso inactivación aparente (causada por el bloqueo lento de la Dd a voltajes mayores a $+20\text{ mV}$; ej. ver Gomez-Lagunas & Armstrong, 1994) comparando el efecto de 5 y 50 mM de potasio extracelular a dos potenciales de mantenimiento (recuperación), -70 y -140 mV , en presencia de $2\mu\text{M}$ de Dd.

El primer experimento se realizó con 5 mM de potasio extracelular y con un potencial de recuperación entre pulsos de -70 mV , se usó un protocolo de dos pulsos iguales y el tiempo entre ambos pulsos fue variando, con el objetivo de observar la recuperación de la inactivación aparente del canal al potencial de recuperación (-70 mV), la cual fue del 80 % con una diferencia entre pulsos de 300 ms (Fig. 28). Ese mismo protocolo se exploró con un potencial de recuperación de -140 mV , y posteriormente se probó el efecto de 50 mM de potasio

extracelular.

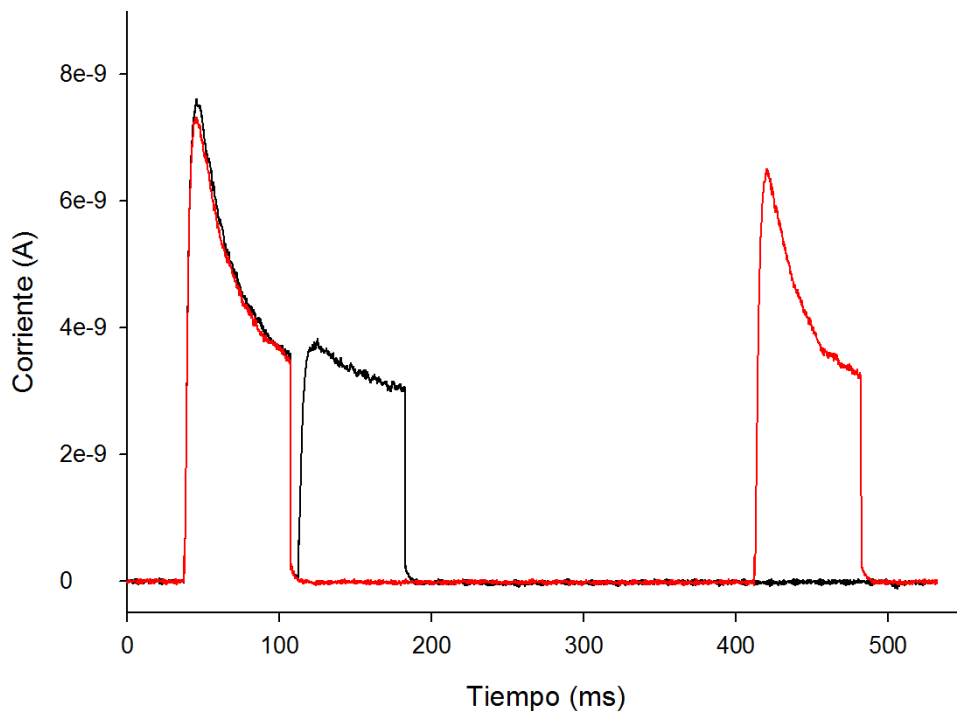


Figura 28. Protocolo de recuperación de la inactivación aparente del canal Kv10.1 en presencia de $2\mu\text{M}$ de Dronedarona. Se muestra un protocolo con un potencial de recuperación de -70 mV con 5 mM de potasio extracelular. En orden, el primer pulso corresponde a la corriente control, el segundo y tercero pulso corresponden al pulso de prueba aplicado en distintos tiempos (5 ms en negro y 300 ms en rojo) después del pulso control.

Los datos de los protocolos de dos pulsos fueron analizados para calcular la recuperación fraccional de la inactivación aparente (r_i) (ver Metodología); en la Figura 29 se puede observar el gráfico de la recuperación fraccional contra el tiempo entre pulsos ante un potencial de -70 mV , con dos concentraciones de potasio (5 mM en círculos negros y 50 mM en círculos blancos); se puede apreciar que en ambas concentraciones los datos se ajustan a una exponencial, $r_i = r_m(1 - \exp(-t/T))$ con parámetros similares, para 5 K_o^+ : $r_m = 0.92$ y $T = 117\text{ ms}$, mientras que para 50 K_o^+ : $r_m = 0.91$ y $T = 93\text{ ms}$, donde los datos no fueron significativamente diferentes entre ambas concentraciones de potasio ($P = 0.833$), lo que muestra que la concentración de potasio extracelular no afecta la tasa de recuperación a -70 mV .

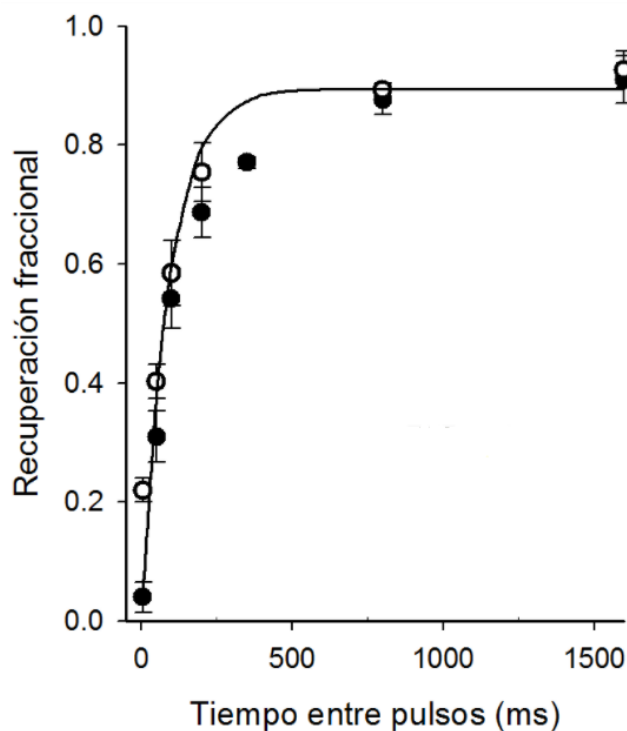


Figura 29. Curva de recuperación de la inhibición contra tiempo entre pulsos, con un potencial de -70 mV con 5 o 50 mM de potasio extracelular (círculos negros y círculos blancos, respectivamente), en presencia de 2 μ M de Dronedaron. La curva que se muestra es el ajuste para los datos de 5 mM de potasio extracelular. La recuperación (desinhibición) se desarrolla en una sola fase. No hubo diferencia significativa entre ambas concentraciones de potasio extracelular ($P = 0.833$).

Considerando la falta de efecto del potasio extracelular a -70 mV se decidió incrementar la fuerza impulsora para el influjo del potasio extracelular, para lo cual se realizó el mismo estudio de recuperación pero ante un potencial de recuperación de -140 mV, los datos de este experimento se pueden apreciar en la Figura 30 donde se observa que: los datos se ajustan a la suma de dos exponenciales, con la ecuación $r_i = r_{m,f}(1-\exp(-t/T_f)) + r_{m,s}(1-\exp(-t/T_s))$, donde $r_{m,f} + r_{m,s} = 1$ son los grados máximos de recuperación alcanzados en cada fase rápida (f) y lenta (s); lo que significa que la desinhibición se desarrolla en dos fases una rápida y otra comparativamente lenta. Parecido a lo obtenido con -70 mV, los parámetros exponenciales fueron estadísticamente similares para las diferentes concentraciones de potasio, siendo para 5 K_o^+ : $r_{m,f} = 0.30$, $r_{m,s} = 0.70$, y $T_f = 4.8$ ms, $T_s = 569$ ms, mientras que para 50 K_o^+ : $r_{m,f} = 0.41$, $r_{m,s} = 0.59$, y $T_f = 7.4$ ms, $T_s = 795$ ms; los datos no muestran diferencia significativa entre los resultados con 5 o 50 mM de potasio ($P = 0.788$).

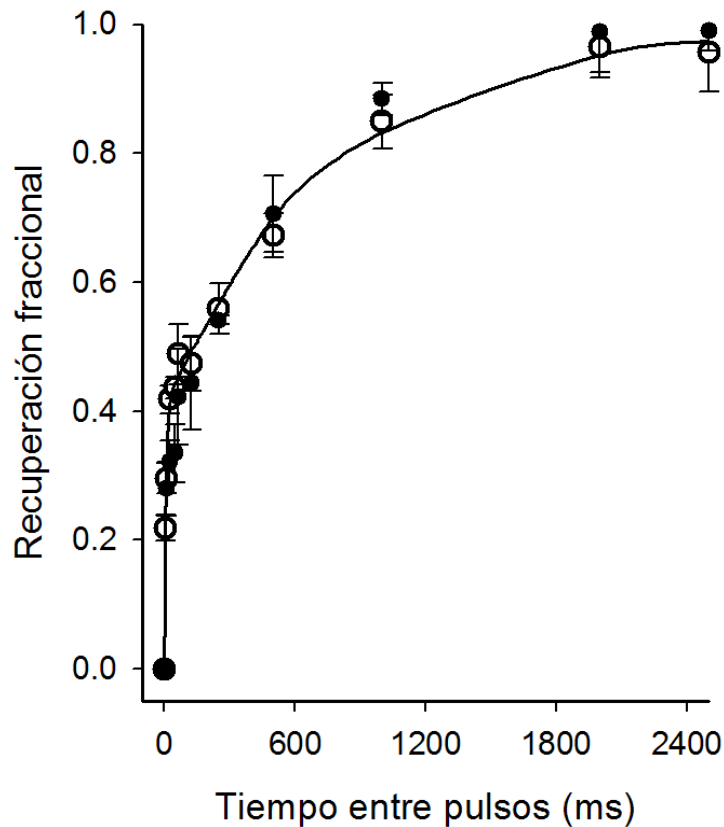


Figura 30. Curva de recuperación de la inhibición contra tiempo entre pulsos, con un potencial de -140 mV entre pulsos con 5 o 50 mM de potasio extracelular (círculos negros y círculos blancos, respectivamente) y en presencia de $2\mu\text{M}$ de Dronedarona. La curva que se muestra corresponde al ajuste de los datos con 5 mM de potasio extracelular. No hubo diferencia significativa entre ambas concentraciones de potasio extracelular ($P = 0.788$). Note que a este voltaje la recuperación de la corriente de potasio ocurre en dos fases, una rápida y otra lenta

Así, no se observó diferencia significativa entre la concentración de 5 o 50 mM de potasio extracelular sobre el tiempo de recuperación en ambos potenciales (-70 y -140 mV). Por otro lado, y relevante en términos del mecanismo de inhibición, en el caso de -140 mV los datos indican que una fracción de las moléculas de Dd queda atrapada en el canal en una conformación relativamente estable de donde se disocia lentamente; esto puede deberse al cierre rápido de los canales a -140 mV, en comparación a su cierre más lento a -70 mV.

Dado que el K^+ no modifica la inhibición por Dd una vez que los canales ya se han cerrado (Fig. 29, 30) se decidió continuar con los experimentos con diferentes concentraciones de potasio extracelular pero en este caso durante el cierre de los canales (Armstrong, 1971).

Para estudiar la interacción de la Dd con los canales $\text{Kv}10.1$ durante el cierre del poro se aplicó un pulso de $+10$ mV durante 100 ms (para abrir los canales) seguido de una repolarización a -100 mV durante 30 ms, desde un potencial de mantenimiento de -70 mV, en

condiciones control y en presencia de $2\mu\text{M}$ de Dd, en presencia de tres concentraciones de potasio extracelular: 5, 50 y 100 mM; y se realizaron mediciones de las corrientes de potasio salientes ($I_{K,\text{salientes}}$) y entrantes ($I_{K,\text{entrante}}$).

Las $I_{K,\text{salientes}}$ se midieron hacia la recta final del pulso y las $I_{K,\text{entrante}}$ fueron evaluadas como se describe en la parte de Metodología; los datos fueron usados para calcular la inhibición fraccional que se muestra en las Figuras 31, 32 y 33.

En presencia de 5 mM de potasio extracelular la inhibición fraccional de la I_K saliente fue de 0.76 ± 0.02 , mientras que para la corriente entrante fue de 0.75 ± 0.01 (Figura 31); por otro lado, en la presencia de 50 mM de potasio extracelular la inhibición fraccional de la I_K saliente fue de 0.64 ± 0.01 y para la corriente entrante fue de 0.63 ± 0.01 (Figura 32).

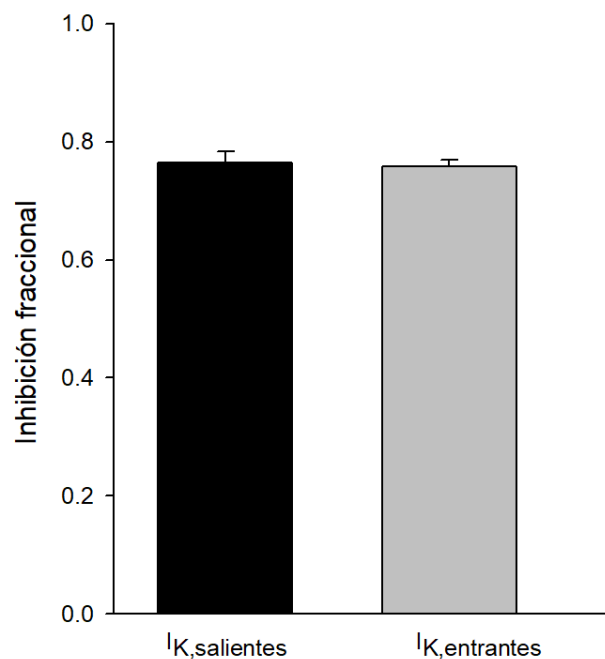


Figura 31. Inhibición fraccional de las corrientes de potasio salientes (0.76 ± 0.02) y de las corrientes entrantes (0.75 ± 0.01) ante 5 mM de potasio extracelular y con $2\mu\text{M}$ de Dronedarona.

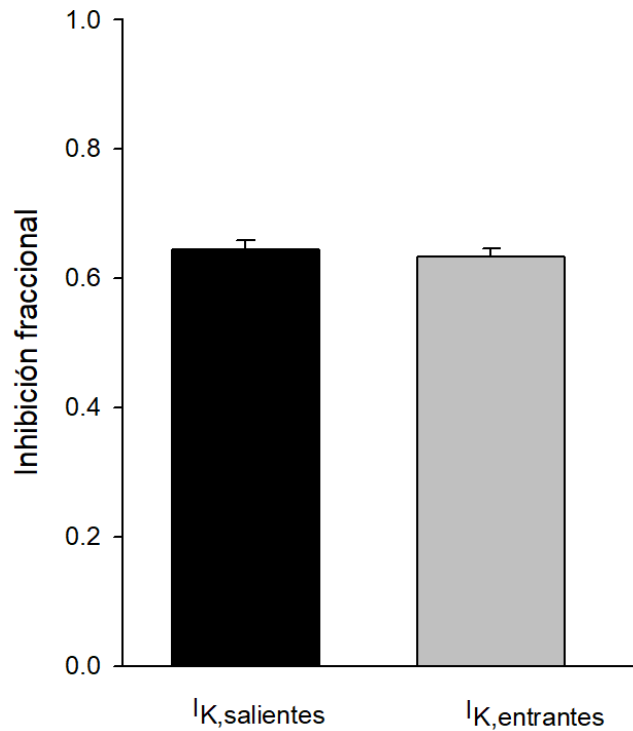


Figura 32. Inhibición fraccional de las corrientes de potasio salientes (0.64 ± 0.01) y de las corrientes entrantes (0.63 ± 0.01) ante 50 mM de potasio extracelular y con $2\mu\text{M}$ de Dronedarona.

En las Figuras 31 y 32 se observa que la inhibición por la Dd en presencia de 5 o 50 mM de potasio extracelular es independiente de la dirección de la corriente de potasio, aunque ambas mediciones fueron menores en presencia de 50 mM de potasio extracelular en comparación con 5 mM (~ 10 a 15 %). Esto es más notorio con 100 mM de potasio extracelular, donde la inhibición fraccional de la $I_{K,salientes}$ fue de 0.65 ± 0.02 y la inhibición fraccional de la $I_{K,entrante}$ fue de 0.52 ± 0.05 , se puede observar la comparación en la Figura 33 donde se aprecia que la corriente entrante es significativamente más pequeña que la corriente saliente ($P = 0.862$), y también es significativamente más pequeña que en presencia de 5 mM ($P = 0.962$) o 50 mM ($P = 0.961$) de potasio extracelular.

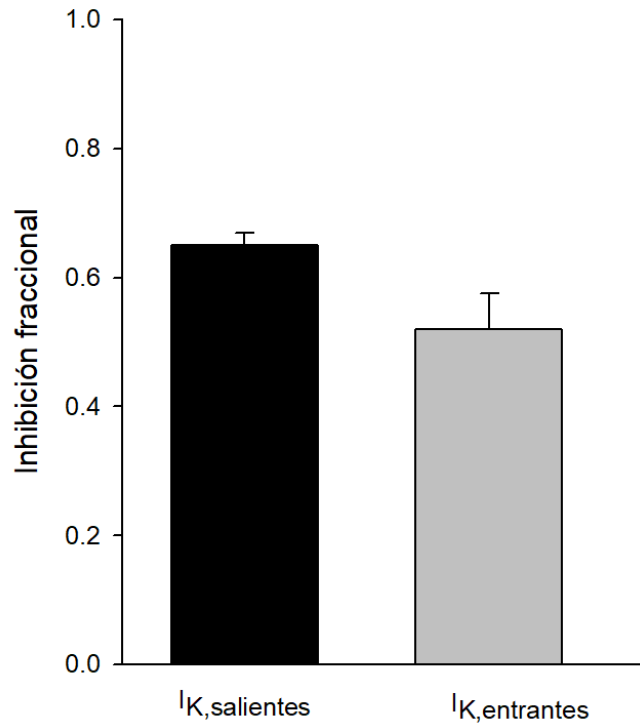


Figura 33. Inhibición fraccional de las corrientes de potasio salientes (0.65 ± 0.02) y de las corrientes entrantes (0.52 ± 0.05) ante 100 mM de potasio extracelular y con $2\mu\text{M}$ de Dronedaron.

En la Figura 33 se puede observar que la inhibición fraccional por Dd es más pequeña en las corrientes entrantes que en las corrientes salientes lo cual es esperable de un efecto desestabilizador, sobre el bloqueo por Dd, causado por K^+ entrante.

5.2. Efecto de la Dronedaron sobre el corrimiento Cole-Moore

Dada la relación de la Dd con la Ad, por la similitud de sus estructuras químicas, se buscó saber si la Dd, al igual que la Ad (Figura 34), inhibiría el fenómeno del corrimiento Cole-Moore del canal $\text{Kv}10.1$.

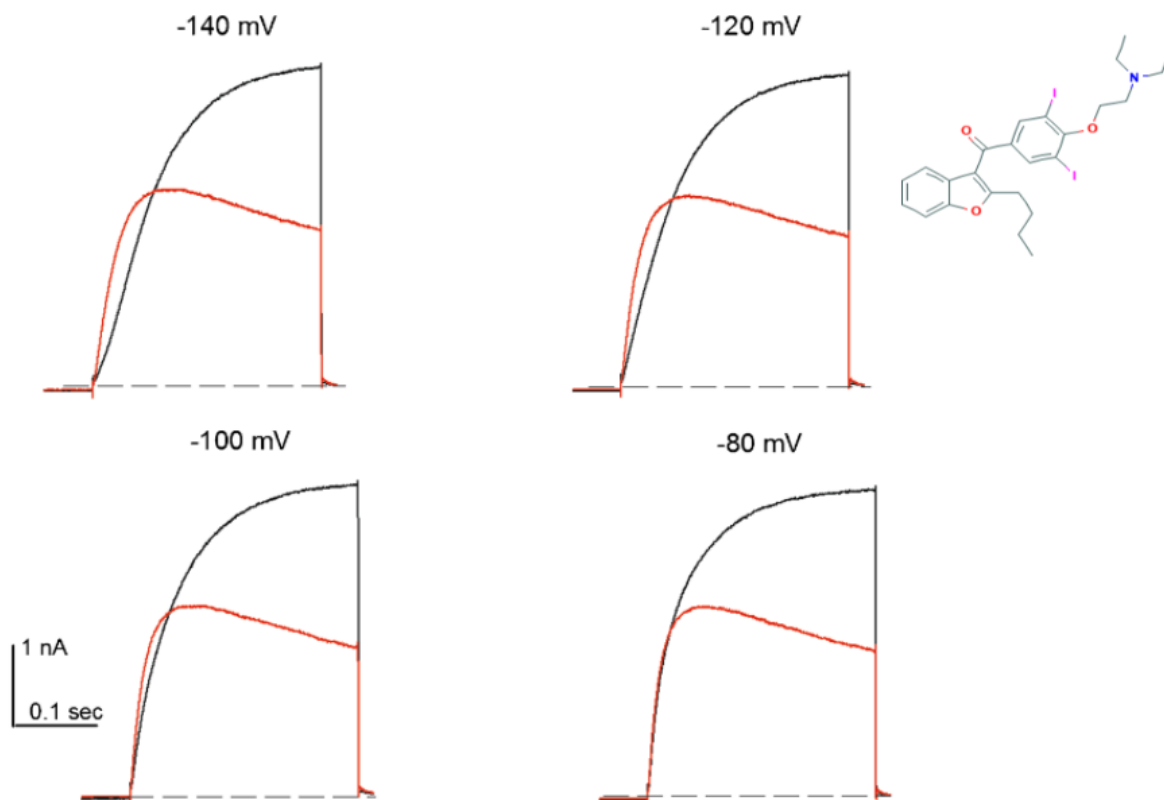


Figura 34. Inhibición del corrimiento Cole-Moore por el fármaco Amiodarona desde diferentes potenciales de mantenimiento y con un pulso de prueba de + 30 mV, en negro se observan las corrientes control y en rojo las corrientes en presencia de 1 μ M de Amiodarona. A un costado superior se observa la estructura de la Amiodarona (Tomado de Barriga-Montoya *et al.*, 2018).

Como se observa en la Figura 34, I_K en presencia de Ad presenta un adelanto en su activación y pierde la cinética sigmoideal típica que se observa en la corriente control (negro) al activarse desde potenciales negativos ($V_m < -100$ mV), en este caso -140 mV, ese fenómeno demuestra la inhibición del corrimiento Cole-Moore del canal Kv10.1 (Gomez-Lagunas *et al.*, 2017; Barriga-Montoya *et al.*, 2018); por el contrario, como se observa en la Figura 35, en presencia de Dd la corriente no presenta inhibición del corrimiento Cole-Moore (rojo) y se sigue observando la cinética sigmoideal que se observa en condiciones control (negro).

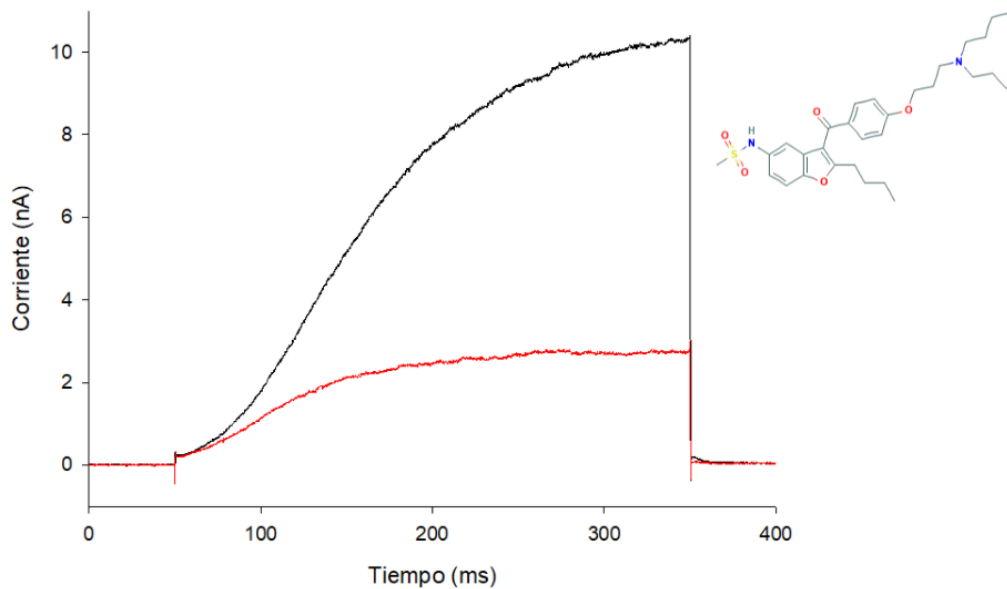


Figura 35. Efecto del fármaco Dronedrona sobre el corrimiento Cole-Moore. Se observa la corriente de potasio en condiciones control (negro) y en presencia de 5 μM de Dronedrona (rojo), desde un potencial de mantenimiento de -140 mV . A un costado superior se observa la estructura de la Dronedrona.

El efecto de la Dd difiere del efecto de la Ad (Barriga-Montoya *et al.*, 2018) sobre el corrimiento Cole-Moore, lo cual es contrario a lo que se esperaba dada la similitud de sus estructuras, pues dado que la Ad inhibe tanto la I_K como el corrimiento Cole-Moore se esperaba lo mismo de la Dd, sin embargo, ésta última sólo inhibe la I_K , lo que indica que pese a su similitud se unen a diferentes partes del canal $Kv10.1$. Así nos preguntamos si aun en su efecto común de inhibir la corriente de potasio estas moléculas se podrían unir a sitios distintos, para indagar esta posibilidad se decidió realizar experimentos de competencia entre ambos fármacos en su inhibición de la corriente de potasio.

5.3. Prueba de competencia entre la Dronedrona y la Amiodarona

A pesar de su similitud estructural con la Ad, no se observó efecto de la Dd sobre el corrimiento Cole-Moore. Esto indica que ambos compuestos pueden tener una unión diferencial en $Kv10.1$, por lo tanto se decidió analizar la interacción de ambos compuestos en su inhibición de la I_K , específicamente se buscó determinar si estos compuestos se unirían al mismo sitio en su inhibición de la I_K . Para esto, se realizó una prueba de competencia Cornish-Bowden (Metodología), para lo cual se evocaron corrientes de potasio con un pulso de $+20\text{ mV}$ desde un potencial de mantenimiento de -70 mV . En la Figura 36 se muestran los trazos de corriente del canal en la fracción Dd/Ad indicada, donde las corrientes en negro corresponden al control y las corrientes en rojo corresponden a la corriente relativa (después de normalizar), en respuesta a la fracción P, donde la concentración de los fármacos en $P = 0$ corresponde a la K_d de la Ad, en $P = 0.5$ corresponde a la mitad de la K_d de cada uno de los compuestos combinados,

y en $P = 1$ corresponde a la K_d de la Dd.

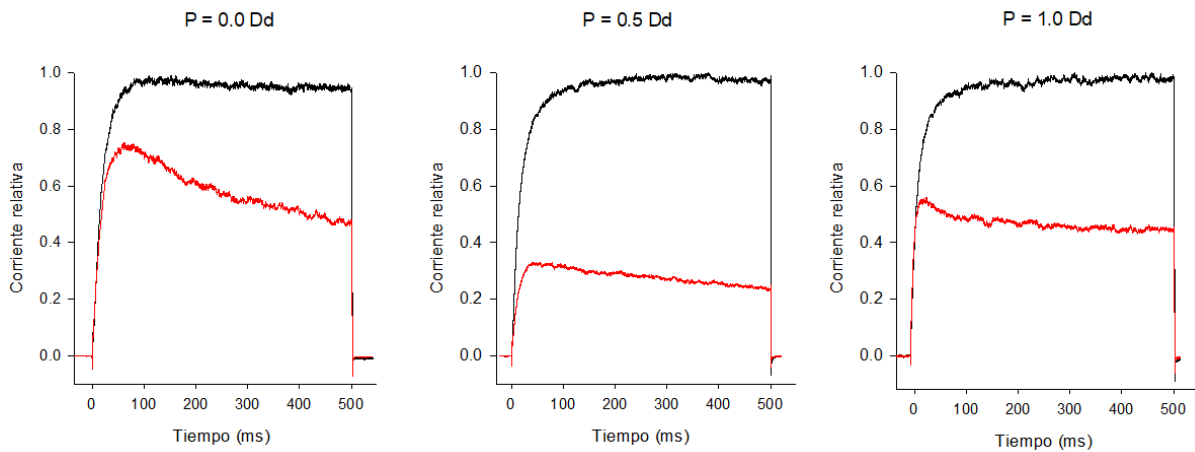


Figura 36. Gráfico de competencia tipo Cornish-Bowden entre los fármacos Dronedaron y Amiodarona, donde $P = (1-p)*[Dd]_{0.5} + p*[Ad]_{0.5}$, y P igual a la fracción relativa de Dd. En negro se observan las corrientes control y en rojo las corrientes en respuesta a la fracción P correspondiente.

En la Figura 36 se observa que en la fracción $p = 0.5$ la corriente relativa disminuye aproximadamente 75 %, mientras que en las otras fracciones P la fracción inhibida es menor. Lo anterior se aprecia mejor en la Figura 37, donde se grafica la fracción inhibida contra la fracción de Dd; el resultado del gráfico indica que pese a la similitud estructural de los fármacos, la Dd y la Ad se unen a sitios distintos en la proteína, inhibiendo la I_K de forma sinérgica.

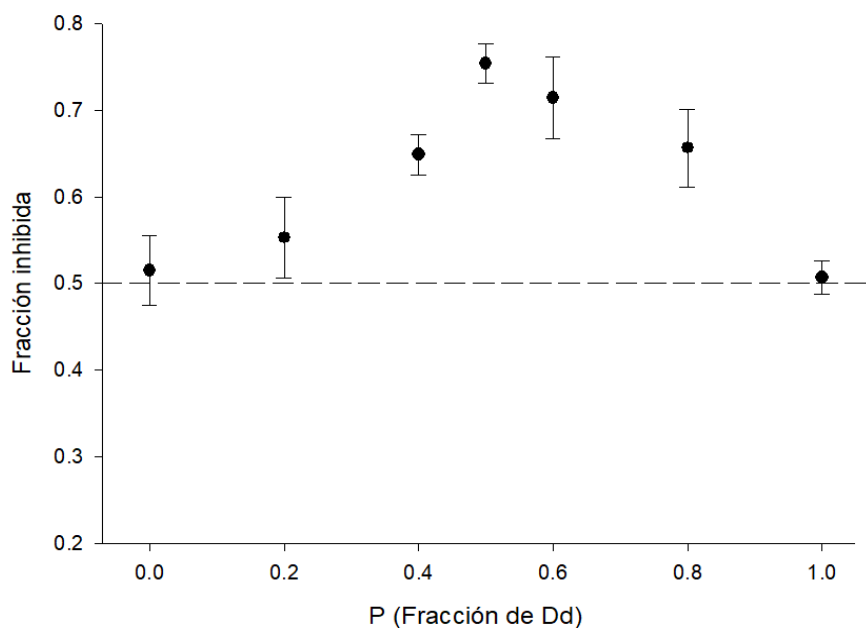


Figura 37. Fracción inhibida de la corriente de potasio contra la fracción de Dronedaron aplicada; la línea punteada corresponde al 50 % de la inhibición.

Para apoyar el resultado del gráfico de competencia Cornish-Bowden se graficaron las K_d aparentes ($K_{d,app}$), la cual representa la aparente afinidad del fármaco por el canal Kv10.1, en función del voltaje membranal, para la Dd y la Ad (Fig. 38). Se realizó un ajuste con la ecuación de Woodhull con la cual se obtuvo la distancia eléctrica (d) de cada uno de los compuestos, siendo la distancia eléctrica de la Dd de 0.16 mientras que la distancia eléctrica de la Ad es de 0.51.

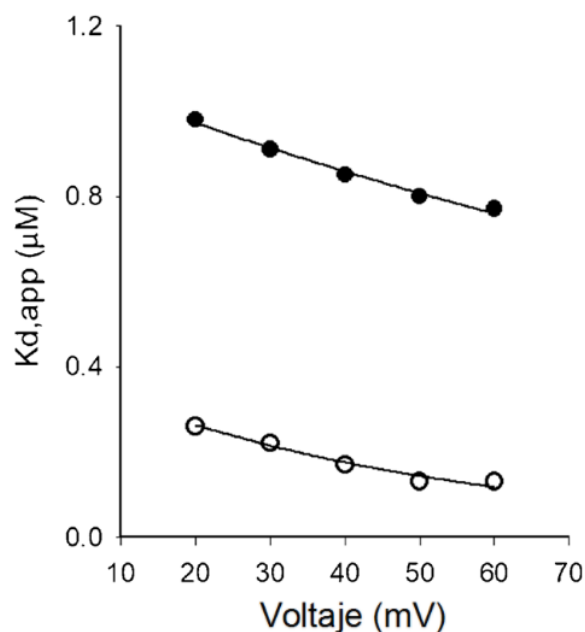


Figura 38. Comparación de las K_d aparentes ($K_{d,app}$) contra el voltaje membranal en presencia de los fármacos Dronedarona (círculos negros) y Amiodarona (círculos blancos). Ambas líneas son ajustes con la ecuación de Woodhull, de donde se obtuvo para la Dronedarona: $d = 0.16$ y $K_{d(0)} = 1.1 \mu\text{M}$; y para la Amiodarona: $d = 0.51$ y $K_{d(0)} = 0.39 \mu\text{M}$.

La diferencia de las distancias eléctricas apoya el resultado de la competencia tipo Cornish-Bowden de que los fármacos Dd y Ad se unen a sitios independientes en el canal Kv10.1 ejerciendo un efecto inhibitorio sinérgico.

6. Discusión

Debido a la importancia fisiológica del canal Kv10.1 es importante estudiarlo explorando los compuestos que pudiesen afectar su funcionamiento. Debido a su papel activo en la proliferación celular es de suma importancia conocer cómo es que se puede inhibir su función sin interferir con el funcionamiento de otras proteínas, para lo cual es necesario encontrar inhibidores/inactivadores que modulen al canal Kv10.1. En particular ya que se sabe que las toxinas peptídicas, como las presentes en venenos de alacranes, no pueden interaccionar con el poro, debido a las hélices que se extienden sobre el vestíbulo del mismo, es importante estudiar la interacción de compuestos no peptídicos en el canal sobre todo de aquellos que son de importancia clínica, como es el caso del antiarrítmico Dronedarona, lo cual permitiría encontrar de forma rápida y económica fármacos contra la proliferación celular.

6.1. Efecto de la Dronedarona en la corriente de potasio

Estudios anteriores realizados con la Ad, antiarrítmico precursor de la Dd, demostraron que la Ad inhibe dos características del canal Kv10.1: la I_K y el corrimiento Cole-Moore (Barriga-Montoya *et al.*, 2018), esto último es una característica de gran relevancia en el estudio del canal Kv10.1 debido a que es el diferencial electrofisiológico para reconocer a los canales Kv10.1 de otros canales de potasio en los diversos sistemas de expresión y, además, es una característica que permite estudiar el *gating* del canal Kv10.1. Por lo anterior es de importancia comprender el corrimiento Cole-Moore y también localizar fármacos que permitan inhibir de forma específica la I_K y el corrimiento Cole-Moore, por ello se decidió estudiar la interacción de la Dd con el canal Kv10.1. Cabe señalar que nuestro laboratorio fue el primero en reportar dos fármacos que inhiben el Cole-Moore de Kv10.1 (Gómez-Lagunas *et al.*, 2017b; Barriga-Montoya *et al.*, 2018).

En este trabajo demostramos que la Dd, al igual que la Ad, inhibe la I_K de Kv10.1 de una manera voltaje dependiente pues, como se puede observar en las Figuras 23 y 24, conforme el voltaje aumenta se presenta una mayor inhibición de las corrientes de potasio. Además, a partir de +20 mV, voltaje desde el cual la probabilidad de apertura del canal se va acercando a la saturación (~ 1), se observa una inactivación aparente inducida por Dd la cual es indicativa de un bloqueo de tipo lento de I_K (esto es, lento en comparación a la cinética de activación a esos voltajes de membrana). Por otro lado, la comparación de las curvas de activación e inhibición de estado estacionario sugiere que Dd es un bloqueador de poro abierto, que por tanto bloquea a Kv10.1 por el lado intracelular. Es decir, para que la Dd tenga acceso a su punto de interacción con el canal es necesario que el canal esté abierto, o sea que las hélices del poro le permitan el acceso, y esto ocurre cuando los canales se activan con voltajes despolarizantes aumentando así la cantidad de canales abiertos y, por lo tanto, incrementando la interacción de la Dd con el canal Kv10.1

Una diferencia entre los fármacos es que la afinidad de la Dd aumenta conforme el voltaje incrementa, esto fue estudiado mediante la ecuación de Woodhull a los datos de la afinidad aparente (K_a) ante distintos voltajes donde la probabilidad de apertura del canal se encuentra

cerca de la saturación ($P_o \sim 1$), con lo cual se obtuvo que la distancia eléctrica (d) de la Dd es de 0.16; es decir que el lugar de unión de la Dd en el canal Kv10.1 detecta el 16 % de la caída del voltaje a través de la membrana, lo cual difiere de la distancia eléctrica del antiarrítmico Ad ($d = 0.5$). Esto es, el bloqueo por Ad tiene una mayor sensibilidad al voltaje que el de Dd.

La interacción de la Dd con el canal es de 1 a 1, en otras palabras una molécula de Dd interactúa con un único sitio en el canal Kv10.1 en su inhibición de la I_K ; esto se obtuvo con el ajuste de la ecuación de Hill a la curva de inhibición fraccional vs concentración de Dd, donde se obtuvo que el número de Hill (n_H) = 0.92. Además, la K_d a +30 mV = 0.9 μ M obtenida muestra que la interacción molécula-canal es de alta afinidad. El n_H fue similar al obtenido para la Ad ($n_{HAd} = 0.91$) en su bloqueo de la corriente de potasio.

Dado que la inhibición por Dd es de tipo lento a voltajes mayores a +20 mV, induciendo por lo tanto una inactivación aparente de I_K se estudió la cinética de recuperación de la corriente ante 5 y 50 mM de potasio extracelular, a los potenciales de recuperación de -70 y -140 mV (con un protocolo igual aplicado a la recuperación de la inactivación, por ejemplo ver Gomez-Lagunas & Armstrong, 1994).

Al cambiar la fuerza impulsora del potasio ($\Delta\mu K$), haciendo el potencial de recuperación -140 mV, la recuperación del bloqueo no presenta una dependencia monótona (de una exponencial) como al potencial de recuperación de -70 mV. En cambio, la recuperación a -140 mV sigue un curso temporal de dos exponenciales, lo que sugiere que una fracción de moléculas de Dd quedan atrapadas en los canales al cerrarse estos más rápido a -140 mV en comparación a su cierre más lento a -70 mV.

Finalmente, la fase rápida de la recuperación a -140 mV es significativamente más rápida que la recuperación a -70 mV, lo que sugiere que el salto inicial de voltaje desde el pulso activador (+50 mV) hacia -140 mV desestabiliza el estado bloqueado por Dd, debido al incremento en $\Delta\mu K$, en comparación con -70 mV.

La fase lenta sugiere que a -140 mV una fracción de los canales (60-70 %) atrapa moléculas de Dd en una conformación donde la salida de la Dd del canal es más lenta, como se mencionó, esto puede ser debido a que una desactivación rápida de los canales desde ese voltaje atrapa y estabiliza a una fracción de moléculas de Dd dentro de los canales.

El estudio del efecto del potasio sobre el cierre de los canales con diferentes concentraciones de potasio demostró que concentraciones elevadas de potasio extracelular (100 mM) disminuyen, aunque ligeramente, el bloqueo de Dd, lo cual se espera de un efecto desestabilizador de iones de potasio entrantes sobre la unión de un inhibidor cargado que bloquea el poro desde el lado intracelular de la membrana (Armstrong, 1971), de acuerdo con un mecanismo de inhibición por poro abierto.

6.2. Diferencias entre las moléculas Dronedaron y Amiodarona

Dado que la Dd se desarrolló a partir de la Ad, cuidando que fuese menos tóxica, pero con el objetivo de tratar la misma enfermedad, se esperaba que ambas tuvieran el mismo efecto sobre el canal Kv10.1; sin embargo, pese a sus similitudes químicas afectan al canal de forma diferente, de lo que se deduce que interactúan con el canal Kv10.1 de distinta manera.

La principal diferencia que se identificó es que la molécula Ad además de inhibir la I_K también inhibe el corrimiento Cole-Moore, lo cual significa que la Ad interactúa con el dominio sensor del voltaje (S1-S4); no obstante, la molécula Dd no inhibe el corrimiento Cole-Moore o sea que, contrario a la Ad, la Dd no interactúa con el dominio sensor de voltaje o con otro dominio que afecte el *gating* del canal (dominio PAS y/o CNBHD).

Otra diferencia importante es la forma de interacción sobre el canal Kv10.1 al inhibir la I_K pues, pese a que ambas disminuyen el flujo de potasio, lo hacen desde diferentes sitios del poro, como se diferencia en sus distancias eléctricas de bloqueo, así como en la curva de competencia Cornish-Bowden, donde la curva refleja que los fármacos se unen de forma sinérgica. La fracción de la caída total del potencial eléctrico en el sitio de unión de la Ad es de 0.5 mientras que para la Dd es de 0.16. Aunado a lo anterior está la afinidad de los fármacos por el canal, pues mientras que la K_d de la Dd es de 1 μM con un voltaje de +30 mV, la K_d de la Ad es de 203 nM con un voltaje de +40 mV.

La diferencia en el efecto de ambos fármacos sobre el canal Kv10.1 se debe a la diferencia en sus estructuras químicas, la Ad presenta dos yodos mientras que la Dd carece de ellos y posee un grupo metanosulfonato, grupo añadido para acortar la vida media del compuesto en el cuerpo decreciendo su lipofilidad (Santos *et al.*, 2015), el cual presenta un área de superficie polar topológica de 68.5 \AA^2 (NCBI, 2021c); por otro lado el tamaño total de la Dd podría interferir en la interacción con el canal Kv10.1, pues presenta un área de superficie polar topológica de 97.2 \AA^2 (Figura 40. NCBI, 2021a,b), contando con el grupo metanosulfonato, mientras que la superficie polar topológica de la Ad es de tan solo 42.7 \AA^2 (Figura 39. NCBI, 2021a,b).

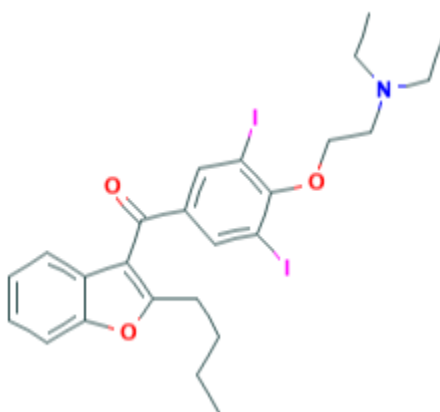


Figura 39. Estructura química de la Amiodarona, antiarrítmico Clase III, $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{ClI}_2\text{NO}_3$, es una sal de clorhidrato de un benceno rico en iones yodo (rosa), con un área de superficie

polar topológica de 42.7 \AA^2 (NCBI, 2021b).

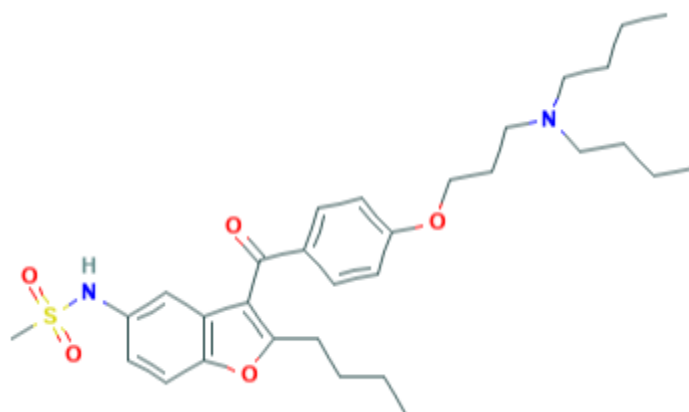


Figura 40. Estructura química de la Dronedarona, antiarrítmico Clase III, $C_{31}H_{44}N_2O_5S$, derivado sintético de la Amiodarona, con un área de superficie polar topológica de 97.2 \AA^2 , (NCBI, 2021a).

Para explorar el posible papel de los yodos presentes en la Ad, se realizaron experimentos donde se probó yoduro de potasio (KI) en el canal, tanto en la solución interna como en la solución externa, sin embargo, no se observó algún cambio ni en la I_K o en el corrimiento Cole-Moore del canal Kv10.1, con lo cual se deduce que los iones yoduro no tienen una participación activa en la inhibición de estas características electrofisiológicas del canal. Con lo anterior se puede proponer que la diferencia electrofisiológica que causan los fármacos sobre el canal Kv10.1 es el grupo metanosulfonato.

6.3. Interacción de la Dronedarona con otros canales

Cabe mencionar que casi no existen compuestos que sean específicos para un solo blanco, ni siquiera entre las toxinas de venenos (una excepción sería tal vez la ouabaina y digitálicos cardiacos que inhiben la bomba de Na-K), por lo que en términos de farmacología se busca un compromiso entre el efecto en el blanco deseado y el efecto sobre otros blancos. Así, la Dd, similar a la Ad, bloquea diversas corrientes; bloquea la corriente marcapasos (I_f) en células transfectadas con HCN4 (Tadros *et al.*, 2016); en miocitos bloquea la corriente cardiaca de sodio (I_{Na}) (97% de bloqueo con $3 \mu\text{mol/L}$), las corrientes de calcio tipo L (I_{CaL}) ($IC_{50} = 0.18 \mu\text{mol/L}$), el componente rápido (I_{Kr}) ($IC_{50} = 59 \mu\text{mol/L}$, en mamíferos) y lento de los rectificadores entrantes de potasio (I_{Ks}) ($IC_{50} = 10 \mu\text{mol/L}$), bloquea, la I_K dependiente de acetilcolina ($I_{K,Ach}$) ($IC_{50} = 10 \text{ nmol/L}$), también bloquea los receptores β -adrenérgicos (Patel *et al.*, 2009), por otro lado también incrementa las corrientes cardiacas transitorias salientes de potasio (I_{to}) (20 % de incremento ante $1 \mu\text{mol/L}$) (Patel *et al.*, 2009).

También se ha reportado que la Dd inhibe el canal cardiaco de dos poros K2P3.1 ($IC_{50} = 6.1\mu M$), al canal K2p2.1 ($IC_{50} = 5.2\mu M$) (Schmidt *et al.*, 2012), al canal Kir2.1 con baja afinidad ($> 30\mu M$) (Xynogalos *et al.*, 2014), a los canales KvLQT1/minK con baja afinidad (30% con $100\mu M$) y las corrientes de los canales HERG ($IC_{50} = 9.2\mu M$) (Thomas *et al.*, 2003).

Como se puede observar, la Dd es un fármaco inespecífico que afecta a toda una serie de corrientes iónicas, sin embargo, la concentración a la cual afecta a los canales Kv10.1 es menor a la concentración requerida para afectar otras corrientes iónicas, lo cual aumenta la versatilidad del fármaco; aunado a lo anterior se ha reportado que la Dd tiene efecto citotóxico contra la proliferación celular en líneas celulares de cáncer de mama (Elliott *et al.*, 2018), aumentando su potencial como agente anticancerígeno.

En conjunto los fármacos Ad y Dd presentan una gran oportunidad para estudiar el *gating* del canal Kv10.1 tanto por su similitud como por sus diferencias químicas, coligado al efecto que tienen sobre el canal Kv10.1, lo cual también puede ser usado para combatir la proliferación celular. Por un lado, su posible papel en contra de la proliferación celular se estima que podría ser a través de la inhibición de la corriente de potasio; pero otra forma en que se podrían usar estos fármacos contra la proliferación celular es explorando más la modificación del *gating* del canal, pues esto podría afectar otras características celulares tales como el citoesqueleto, lo cual es importante debido a que estudios recientes relacionan el efecto proliferativo del canal Kv10.1 con cambios en el citoesqueleto, el cual sufre una serie de cambios durante el ciclo celular, especialmente durante la fase M, y se ha reportado que los cambios sufridos por el citoesqueleto al inicio de la fase M y durante la transición G2/M modifica las propiedades electrofisiológicas del canal Kv10.1 (Camacho *et al.*, 2000). Estudios más recientes han mostrado que el canal Kv10.1, así como su gen KCNH1, está relacionado con las vías HIF1 α y p53; se ha encontrado que p53 regula mediante una retroalimentación negativa la expresión del canal Kv10.1 a través de miR34 (Lin *et al.*, 2011), mientras que Kv10.1 incrementa la expresión de HIF1 α lo que a su vez incrementa el factor de crecimiento endotelial vascular y por lo tanto incrementa la vascularización tumoral (Downie *et al.*, 2008); la interacción del canal Kv10.1 y de su gen KCNH1 con HIF1 α y p53 es de suma importancia, pues, se sabe que estos factores regulan la homeostasis mitocondrial en células cancerígenas.

Por otro lado, mediante estudios bioinformáticos se ha encontrado que los fármacos Ad y Dd pueden ser reposicionados para tratar cáncer de ovario (Nagaraj *et al.*, 2018), siendo dos de los mejores candidatos. El reposicionamiento de fármacos tiene un gran impacto pues permite identificar nuevos usos de un medicamento ya aprobado y seguro para el ser humano, lo que reduce significativamente los efectos secundarios sobre los pacientes, los costos y el tiempo de investigación y desarrollo, permitiendo así encontrar nuevos tratamientos para enfermedades tales como el cáncer.

El estudio farmacológico de los canales Kv10.1 aún tiene mucho por delante, y es indispensable seguir estudiando esta proteína debido a la gran importancia que tiene tanto en la proliferación celular como en otros síndromes neurológicos para así poder desarrollar terapias eficientes en contra de dichos padecimientos.

7. Conclusión

El laboratorio ha dado un aporte significativo, tanto en el estudio de la inhibición de la I_K como en la inhibición del corrimiento Cole-Moore del canal Kv10.1. En el caso de la inhibición del corrimiento Cole-Moore el nuestro fue el primer laboratorio en lograrlo, esto se obtuvo empleando Mibefradil y Amiodarona como moléculas moduladoras. Ambos fármacos presentan características químicas muy diferentes a pesar de estar estructuralmente relacionados, lo que a su vez permite usar sus diferencias para comprender cómo es que interactúan con el canal Kv10.1.

En este trabajo se continuó con el estudio farmacológico a través del derivado de la Ad, la Dronedarona, de la cual se encontró que a diferencia de su precursor inhibe la I_K pero no el corrimiento Cole-Moore, lo que implica que la Ad interactúa, directa o indirectamente, tanto con el dominio sensor del voltaje como con el dominio del poro, mientras que la Dd sólo interactúa, directa o indirectamente con el dominio del poro. En la Figura 41 se puede apreciar un resumen de la diferencia.

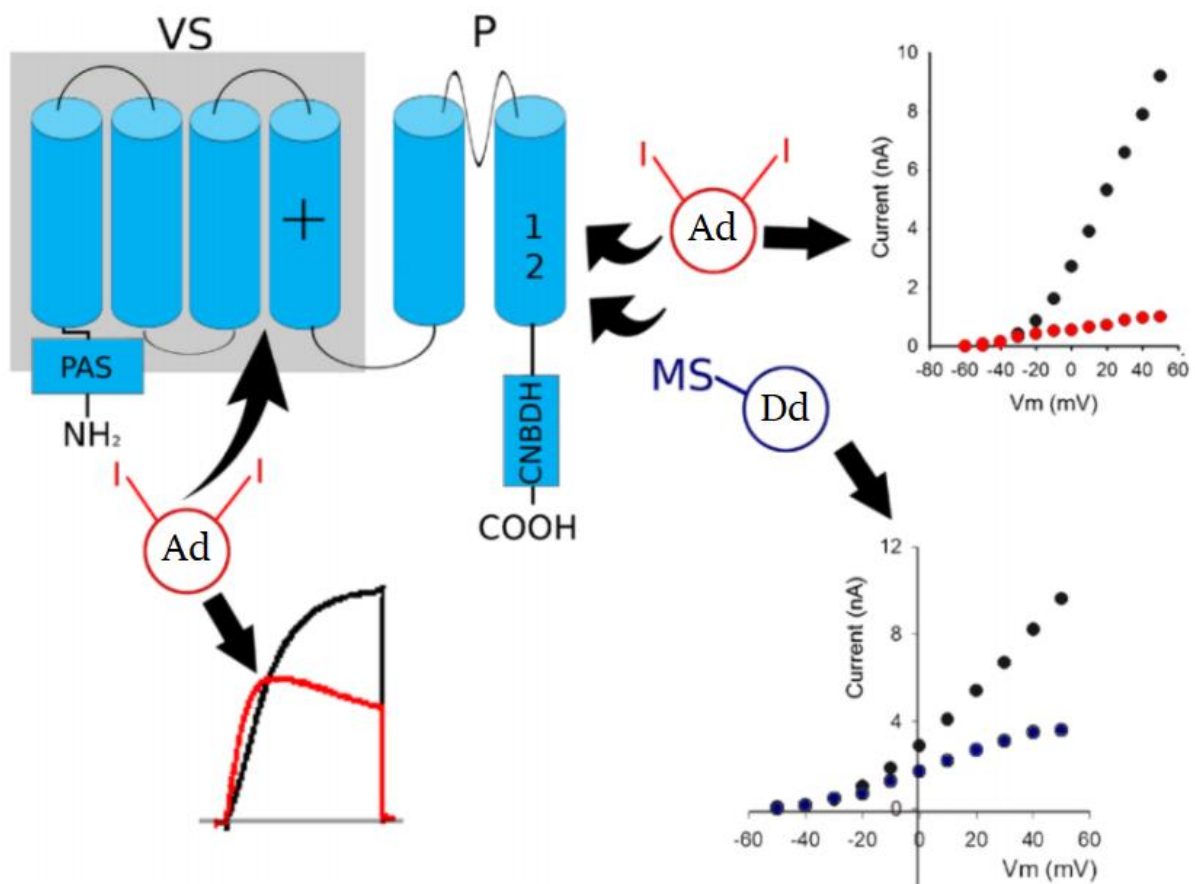


Figura 41. Interacción de la Dronedarona y la Amiodarona en el canal de potasio Kv10.1. Ad, Amiodarona; Dd, Dronedarona; MS, grupo metanosulfonato; VS, dominio sensor del voltaje; P, dominio del poro (Tomado de Meléndez *et al.*, 2019).

8. Bibliografía

- Adlan AMA, Lip GYH. (2013) Benefit-risk assessment of dronedarone in the treatment of atrial fibrillation. *Drug Saf.* 36(2):93-110.
- Armstrong CM. (1971) Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons. *J Gen Physiol.* 58(4):413-37.
- Armstrong CM, Hille B. (1998) Voltage-gated ion channels and electrical excitability. *Neuron.* 20(3):371-80.
- Barriga-Montoya C, Huanosta-Gutiérrez A, Reyes-Vaca A, Hernández-Cruz A, Picones A, Gómez-Lagunas F. (2018) Correction to: Inhibition of the K⁺ conductance and Cole-Moore shift of the oncogenic Kv10.1 channel by amiodarone. *Pflugers Arch.* 470(6): 981-993.
- Bauer CK, Schwarz JR. (2018) Ether-à-go-go K⁺ channels: effective modulators of neuronal excitability. *J Physiol.* 596(5):769-783.
- Bauer CK, Schwarz JR. (2001) Physiology of EAG K⁺ channels. *J Membr Biol.* 182(1):1-15.
- Brüggemann A, Pardo L A, Stühmer W, Pongs O. (1993) Ether-à-go-go encodes a voltage-gated channel permeable to K⁺ and Ca²⁺ and modulated by cAMP. *Nature.* 365 (6445):445-8.
- Camacho J, Sánchez A, Stühmer W, Pardo LA. (2000) Cytoskeletal interactions determine the electrophysiological properties of human EAG potassium channels. *Pflugers Arch.* 441(2-3):167-74.
- Camacho J. (2006) Ether à go-go potassium channels and cancer. *Cancer Lett.* 233(1):1-9.
- Carlson A, Brelidze T, Zagotta W. (2013) Flavonoid regulation of EAG1 channels. *J Gen Physiol.* 141(3):347-58.
- Chevillard C, Cárdenas ML, Cornish-Bowden A. (1993) The competition plot: a simple test of whether two reactions occur at the same active site. *Biochem J.* 289 (Pt 2): 599–604.
- Cole KS, Moore JW. (1960) Ionic current measurements in the squid giant axon membrane. *J Gen Physiol.* 44:123-67.
- Doyle DA, Cabral JM, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science.* 280(5360):69-77.
- Downie BR, Sánchez A, Knötgen H, Contreras-Jurado C, Gymnopoulos M, Weber C, Stühmer W, Pardo LA. (2008) Eag1 expression interferes with hypoxia homeostasis and induces angiogenesis in tumors. *J Biol Chem.* 283 (52): 36234-40.
- Elliott MJ, Jerzak KJ, Cockburn JG, Safikhani Z, Gwynne WD, Hassell JA, Bane A, Silvester J, Thu KL, Haibe-Kains B, Mak TW, Cescon DW. (2018) The Antiarrhythmic Drug, Dronedarone, Demonstrates Cytotoxic Effects in Breast Cancer Independent of Thyroid Hormone Receptor Alpha 1 (THR α 1) Antagonism. *Sci Rep.* 8(1):16562.
- Ganetzky B, Robertson GA, Wilson GF, Trudeau MC, Titus SA. (1999) The eag family

- of K⁺ channels in *Drosophila* and mammals. *Ann N Y Acad Sci.* 868:356-69.
- Gómez-Lagunas F, Armstrong CM. (1994) The relation between ion permeation and recovery from inactivation of ShakerB K⁺ channels. *Biophys J.* 67(5):1806-15.
 - Gómez-Lagunas F and Barriga-Montoya C. (2017)a Mibefradil inhibition of the Cole-Moore shift and K⁺-conductance of the tumor-related Kv10.1 channel. *Channels (Austin).* 11(5):373-376.
 - Gómez-Lagunas F, Carrillo E, Pardo L, Stühmer W. (2017)b Gating modulation of the tumor-related Kv10.1 channel by mibefradil. *J Cell Physiol.* 232(8):2019-2032.
 - Heginbotham L, Lu Z, Abramson T, MacKinnon R. (1994) Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys J.* 66(4):1061-7.
 - Hemmerlein B, Weseloh R, Mello de Queiroz F, Knötgen H, Sánchez A, Rubio ME, Martin S, Schliephacke T, Jenke M, Heinz-Joachim-Radzun, Stühmer W, Pardo L. (2006) Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours. *Mol Cancer.* 5:41.
 - Henry JT, Crosson S. (2011) Ligand-binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context. *Annu Rev Microbiol.* 65:261-86.
 - Hille B. (2001) Ion channels of excitable membranes. Tercera edición. Massachusetts, USA. Sinauer Associates.
 - Ju M, Wray D. (2006) Molecular regions responsible for differences in activation between heag channels. *Biochem Biophys Res Commun.* 342(4):1088-97.
 - Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. (editors) (1995) Essentials of neural science and behavior. Appleton & Lange. Stamford, Connecticut. USA. Cap 7, Ion channels. pp 115 - 131.
 - Kodama I, Kamiya K, Toyama J. (1997) Cellular electropharmacology of amiodarone. *Cardiovasc Res.* 35(1):13-29.
 - Kortüm F, Caputo V, Bauer C, Stella L, Ciolfi A, Alawi M, Bocchinfuso G, Flex E, Paolacci S, Dentici M, Grammatico P, Korenke G, Leuzzi V, Mowat D, Nair L, Nguyen T, Thierry P, White S, Dallapiccola B, Pizzuti A, Campeau P, Tartaglia M, Kutsche K. (2015) Mutations in KCNH1 and ATP6V1B2 cause Zimmermann-Laband syndrome. *Nat Genet.* 47(6):661-7.
 - Lin H, Li Z, Chen C, Luo X, Xiao J, Dong D, Lu Y, Yang B, Wang Z. (2011) Transcriptional and post-transcriptional mechanisms for oncogenic overexpression of ether à go-go K⁺ channel. *PLoS One.* 6 (5):e20362.
 - Long S, Campbell EB, MacKinnon R. (2005) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science.* 309(5736):897-903.
 - Long S, Tao X, Campbell EB, MacKinnon R. (2007) Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature.* 450 (7168) : 376-82.
 - Lörinczi E, Gómez-Posada JC, de la Peña P, Tomczak AP, Fernández-Trillo J, Leipscher U, Stühmer W, Barros F, Pardo L. (2015) Voltage-dependent gating of KCNH potassium channels lacking a covalent link between voltage-sensing and pore domains. *Nat Commun.* 30;6:6672.
 - MacKinnon R. (2003) Potassium channels. *FEBS Lett.* 555(1):62-65.

- McIntosh BE, Hogenesch JB, Bradfield CA. (2010) Mammalian Per-Arnt-Sim proteins in environmental adaptation. *Annu Rev Physiol.* 72:625-45.
- Meléndez TA, Huanosta-Gutiérrez A, Barriga-Montoya C, González-Andrade M and Gómez-Lagunas F. (2019) Dronedarone blockage of the tumor-associated Kv10.1: A comparison with amiodarone. *Pflugers Arch.* 472(1):75-87.
- Mortensen LS, Schmidt H, Farsi Z, Barrantes-Freer A, Rubio ME, Ufartes R, Eilers J, Sakaba T, Stühmer W, Pardo LA. (2015) KV 10.1 opposes activity-dependent increase in Ca²⁺ influx into the presynaptic terminal of the parallel fibre-Purkinje cell synapse. *J Physiol.* 93(1):181-96.
- Nagaraj AB, Joseph P, Kovalenko O, Wang Q, Xu R, DiFeo A. (2018) Evaluating class III antiarrhythmic agents as novel MYC targeting drugs in ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 151(3):525-532.
- National Center for Biotechnology Information (2021)^a. PubChem Compound Summary for CID 208898, Dronedarone. Retrieved January 14, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dronedarone>.
- National Center for Biotechnology Information (2021)^b. PubChem Compound Summary for CID 441325, Amiodarone hydrochloride. Retrieved January 14, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Amiodarone-hydrochloride>.
- National Center for Biotechnology Information (2021)^c. PubChem Compound Summary for CID 72879, Methanesulfonamide. Retrieved June 12, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methanesulfonamide>.
- Occhiodoro T, Bernheim L, Liu JH, Bijlenga P, Sinnreich M, Bader CR, Fischer-Lougheed J. (1998) Cloning of a human ether-à-go-go potassium channel expressed in myoblasts at the onset of fusion. *FEBS Lett.* 434(1-2):177-82.
- Pardo L, Del Camino D, Sánchez A, Alves F, Brüggemann A, Beckh S, Stühmer W. (1999) Oncogenic potential of EAG K⁺ channels. *EMBO J.* 18(20):5540-7.
- Pardo L, Contreras-Jurado C, Zientkowska M, Alves F, Stühmer W. (2005) Role of voltage-gated potassium channels in cancer. *J Membr Biol.* 205(3):115-24.
- Pardo L, Brüggemann A, Camacho J, Stühmer W. (1998) Cell cycle-related changes in the conducting properties of r-eag K⁺ channels. *J Cell Biol.* 143(3):767-75.
- Patel C, Yan G-X, Kowey PR. (2009) Dronedarone. *Circulation.* 120(7):636-44.
- Rodríguez-Rasgado J, Acuña-Macías I, Camacho J. (2012) Eag1 channels as potential cancer biomarkers. *Sensors (Basel).* 12(5):5986-95.
- Santos M, García LC, Checura C, Gandolfi Donadío L, Fernandez C, Orgueira H, Comin M J. (2015) Synthesis and characterization of new related substances of the antiarrhythmic drug dronedarone hydrochloride. *J Pharm Biomed Anal.* 10;114:441-6.
- Schmidt C, Wiedmann F, Schweizer PA, Becker R, Katus HA, Thomas D. (2012) Novel electrophysiological properties of dronedarone: inhibition of human cardiac two-pore-domain potassium (K2P) channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 385(10):1003-16.
- Schönherr R, Gessner G, Löber K, Heinemann S. (2002) Functional distinction of human EAG1 and EAG2 potassium channels. *FEBS Lett.* 514(2-3):204-8.
- Silverman WR, Roux B, Papazian DM. (2003) Structural basis of two-stage voltage-dependent activation in K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100(5):2935-40.

- Simons C, Rash LD, Crawford J, Ma L, Cristofori-Armstrong B, Miller D, Ru K, Baillie GJ, Alanay Y, Jacquinet A, Debray FG, Verloes A, Shen J, Yesil G, Guler S, Yuksel A, Cleary JG, Grimmond SM, McGaughan J, King GF, Gabbett MT, Taft RJ. (2015) Mutations in the voltage-gated potassium channel gene *KCNH1* cause Temple-Baraitser syndrome and epilepsy. *Nat Genet.* 47(1):73-7.
- Tadros R, Nattel S, Andrade JG. (2016) Dronedarone: Basic Pharmacology and Clinical Use. *Card Electrophysiol Clin.* ;8(2):453-65.
- Terlau H, Ludwig J, Steffan R, Pongs O, Stühmer W, Heinemann SH. (1996) Extracellular Mg^{2+} regulates activation of rat eag potassium channel. *Pflugers Arch.* 432(2):301-12.
- Terlau H, Heinemann SH, Stühmer W, Pongs O, Ludwig J. (1997) Amino terminal-dependent gating of the potassium channel rat eag is compensated by a mutation in the S4 segment. *J Physiol.* 502 (Pt 3):537-43.
- Thomas D, Kathofer S, Zhang W, Wu K, Wimmer A-B, Zitron E, Kreye V A W, Katus HA, Schoels W, Karle CA, Kiehn J. (2003) Acute effects of dronedarone on both components of the cardiac delayed rectifier K^+ current, HERG and $KvLQT1/minK$ potassium channels. *Br J Pharmacol.* 140(5):996-1002.
- Warmke JW, Ganetzky B. (1994) A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(8):3438-42.
- Whicher JR, MacKinnon R. (2016) Structure of the voltage-gated K^+ channel Eag1 reveals an alternative voltage sensing mechanism. *Science.* 353(6300):664-9.
- Xynogalos P, Seyler C, Scherer D, Koeppele C, Scholz EP, Thomas D, Katus HA, Zitron E. (2014) Class III antiarrhythmic drug dronedarone inhibits cardiac inwardly rectifying $Kir2.1$ channels through binding at residue E224. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 387(12):1153-61.
- Zhao Y, Goldschen-Ohm MP, Morais-Cabral JH, Chanda B, Robertson GA. (2017) The intrinsically liganded cyclic nucleotide-binding homology domain promotes *KCNH* channel activation. *J Gen Physiol.* 149(2):249-260.