



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EFFECTO MODULADOR DEL ANTIMICÓTICO MICONAZOL SOBRE LOS CANALES
IÓNICOS Kv10.1 Y Nav1.7**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

ENIKAR MANUEL MORALES PATLÁN

TUTOR PRINCIPAL

Dr. ENOCH LUIS BALTAZAR
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. SARA LUZ MORALES LÁZARA
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Dra. ANGÉLICA ALMANZA GUTIÉRREZ
[Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz](#)

Ciudad de México. Marzo, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL
(Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado “Efecto modulador del antimicótico miconazol sobre los canales iónicos Kv10.1 y Nav1.7”, que presenté para obtener el grado de Maestría es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

**Enikar Manuel Morales Patlán
314051464**

1. Agradecimientos institucionales
2. Agradecimientos
3. Índice de figuras
4. Resumen
5. Introducción
 - 5.1. Blancos farmacológicos y sus aplicaciones clínicas
 - 5.2. Potencial de Membrana y Canales Iónicos
 - 5.2.1. Ensayos electrofisiológicos
 - 5.2.2. Ensayos de fluorescencia de alto desempeño contra canales iónicos
 - 5.3. Moléculas pequeñas y el miconazol
 - 5.4. Los canales $K_v10.1$ y $Na_v1.7$
 - 5.5. El colesterol y los canales iónicos
 - 5.6. El miconazol y el canal hERG
6. Antecedentes
7. Justificación
8. Hipótesis
9. Objetivos
 - 9.1. Objetivo general
 - 9.2. Objetivos específicos
10. Metodología
11. Resultados
 - 11.1 Ensayos *patch-clamp*
 - 11.2 Viabilidad Celular
 - 11.3 Ensayos de apoptosis
 - 11.4 Ensayos de tinción de colesterol libre
 - 11.5 Ensayos de inmunoquímica
 - 11.6 Simulaciones acoplamiento molecular
12. Discusión
13. Conclusiones
14. Trabajo a futuro
15. Bibliografía
16. Anexos

1. Agradecimientos Institucionales

Este trabajo fue realizado con el apoyo del proyecto financiado por CONACYT CB-2017/2018-A1-S-13646 cuyo responsable técnico es el Dr. Enoch Luis Baltazar y la beca de maestría otorgada por el CONAHCYT con número de referencia 829454.

Al personal del LaNCa por todo su apoyo, en específico:

A la Dra. **María Luis Durán Pastén** por el apoyo técnico de la presente tesis.

Al Fis. **César Oliver Lara Figueroa** por el apoyo técnico y administrativo en el laboratorio.

Al laboratorista **José Agustín Flores González** por su apoyo en el laboratorio.

También:

Agradezco al personal de cómputo del IFC por su ayuda y soporte técnico durante el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Ruth Rincón Heredia de la Unidad de Microscopia del IFC por su apoyo por su apoyo en la adquisición de imágenes.

Por último, agradezco el apoyo PAEP que me proporcionó la Universidad Autónoma de México para participar en la reunión “Ion Channels Modulation Symposium” organizada por la compañía Sophion en Cambridge, UK, en el Clare College.

2. Agradecimientos

Aprovecho para agradecer a mi familia, quienes han sido un fuerte apoyo para mí a lo largo de mi formación durante la maestría. A mi mamá por todo su cariño, apoyo, comprensión y amor; a mi abuela, que me apoya incondicionalmente en los momentos más complicados; a mi tío por escucharme, apoyarme y hacerme sentir seguro; a Héctor, quien con sus consejos y su manera de ser siempre me ayudó a salir adelante.

Asimismo, agradezco a mis amigos de la infancia, Alexis, Arvizú, Camila, Carolina, Daniel, Karen, Gerardo, Levi, Marisol, Marco, María, Mario, Mitchell, Rodrigo, Valentina. Que me han apoyado, acobijado, y escuchado. Así como a los amigos que me acompañaron durante la maestría, Andrea, Cristopher, Celeste, Darién, Emiliano, Elizabeth, Mirsha, Ricardo, Pavel, Valeria, y todos los integrantes del LaNCA.

A mi novia Karen, por escucharme y apoyarme, por acompañarme en las noches de estudio y los fines de semana de café y trabajo, por todos los detalles que tuviste conmigo, por todos los abrazos y todas las sonrisas, muchísimas gracias.

A Tesla, quien, sin saberlo, siempre es la luz que necesito para seguir adelante.

A toda aquella persona que esté en el camino de la ciencia, y le sirva esta tesis.

3. Índice de figuras

- Figura 1. Histograma de crecimiento de publicaciones referentes a canalopatías
- Figura 2. Ilustración de la técnica de *patch-clamp*
- Figura 3. Esquema que muestra el funcionamiento general del fluoróforo sensor de cambios del potencial de membrana presente en el kit FLIPR®.
- Figura 4. Esquema del canal $K_v10.1$.
- Figura 5. Esquema del canal $Na_v1.7$.
- Figura 6. Ensayo de fluorescencia de potencial de membrana.
- Figura 7. Fluorescencia de potencial de membrana.
- Figura 8. Ensayo de fluorescencia de potencial de membrana.
- Figura 9. Protocolos utilizados para el registro de *patch-clamp* en la línea celular HEK- $K_v10.1$.
- Figura 10. Protocolos utilizados para el registro de *patch-clamp* en la línea celular HEK- $Na_v1.7$.
- Figura 11. Registros de *patch clamp* de célula completa en HEK- $K_v10.1$.
- Figura 12. Ensayos de *Patch-Clamp* en HEK- $K_v10.1$.
- Figura 13. Activación dependiente de voltaje por la técnica *Patch-Clamp* en HEK- $K_v10.1$.
- Figura 14. Inactivación dependiente de voltaje por la técnica de *Patch-Clamp* en HEK- $K_v10.1$.
- Figura 15. Registros de célula completa en HEK- $Na_v1.7$.
- Figura 16. Ensayos de *Patch-Clamp* en HEK- $Na_v1.7$.
- Figura 17. Activación de inactivación dependiente de voltaje por la técnica de *Patch-Clamp* en HEK- $Na_v1.7$.
- Figura 18. Ensayos de viabilidad celular en HEK-WT.
- Figura 19. Ensayos de viabilidad celular en HEK-WT.
- Figura 20. Porcentaje de células HEK-WT vivas y muertas.
- Figura 21. Ensayos de viabilidad celular en HEK- $K_v10.1$.
- Figura 22. Ensayos de viabilidad celular en HEK- $K_v10.1$.
- Figura 23. Porcentaje de células HEK- $K_v10.1$ vivas y muertas.
- Figura 24. Ensayos de viabilidad celular en HEK- $Na_v1.7$.
- Figura 25. Ensayos de viabilidad celular en HEK- $Na_v1.7$.
- Figura 26. Porcentaje de células HEK- $Na_v1.7$ vivas y muertas.
- Figura 27. Ensayo de apoptosis en la línea celular HEK-WT tratadas con miconazol.
- Figura 28. Porcentaje de células HEK-WT apoptóticas (anexina) y muertas (yoduro de propidio).
- Figura 29. Ensayo de apoptosis en la línea celular HEK- $K_v10.1$ tratadas con miconazol.
- Figura 30. Porcentaje de células HEK-WT apoptóticas (anexina) y muertas (yoduro de propidio).

Figura 31. Marcaje de colesterol membranal en las líneas celulares HEK-WT, HEK-K_v10.1 y HEK-Na_v1.7.

Figura 32. Inmunofluorescencia en la línea celular HEK-K_v10.1.

Figura 33. Inmunofluorescencia en la línea celular HEK-Na_v1.7.

Figura 34. Mapa bidimensional de las posibles interacciones de miconazol con el canal K_v11.1.

Figura 35. Simulación de acoplamiento molecular de miconazol con el canal K_v11.1.

Figura 36. Simulación de acoplamiento molecular de miconazol con el residuo de fenilalanina 656 del canal K_v11.1.

Figura 37. Mapa bidimensional de las posibles interacciones de miconazol con el canal K_v10.1.

Figura 38. Simulación de acoplamiento molecular de miconazol con el canal K_v10.1.

Figura 39. Simulación de acoplamiento molecular de miconazol con el residuo de fenilalanina 656 del canal K_v10.1.

4. Resumen

Los canales iónicos son una familia amplia de proteínas transmembranales que permiten el flujo selectivo de iones a través de ellos. Estas proteínas juegan un papel importante en una serie de procesos fisiológicos como el mantenimiento de la osmolaridad celular, el ciclo celular, la generación y propagación de potenciales de acción, la transducción sensorial, entre otras. Sin embargo, una mala regulación de la expresión de estas proteínas contribuye en una serie de procesos patológicos, como es el caso de los canales iónicos dependientes de voltaje $K_v10.1$ y $Na_v1.7$. El primero se encuentra expresado de manera común en el sistema nervioso central (principalmente en el bulbo olfatorio) y el segundo se encuentra expresado en neuronas sensoriales que inervan la piel. Sin embargo, ambos canales se encuentran sobreexpresados en una amplia variedad de tumores, como en el melanoma. Además, la sobreexpresión de estos canales confiere a las células tumorales mayor resistencia a fármacos. Investigaciones recientes muestran que también $K_v10.1$ confiere mayor radioresistencia.

Por ello, es útil inhibir la actividad de estos canales iónicos cuando se encuentran sobreexpresados en un fenotipo tumoral. No obstante, la mayoría de las moléculas que los modulan suelen ser inespecíficas, por lo que tienen la capacidad de interactuar con otros canales iónicos u otras proteínas. De aquí la importancia de encontrar nuevos moduladores farmacológicos de estos canales iónicos.

En el presente trabajo, mostramos al antimicótico miconazol, por primera vez, como un potente inhibidor de estos canales iónicos. Por medio de la técnica electrofisiológica de *patch-clamp* realizada en células HEK transfectadas con el canal iónico $K_v10.1$ y expuestas al miconazol, obtuvimos que tiene un efecto inhibitorio dosis-dependiente con una $IC_{50} = 23.60 \pm 5.00 \mu M$. En el caso de células HEK transfectadas con el canal iónico $Na_v1.7$ no se presentó dicho efecto dosis dependiente. Observamos que a una concentración de $100 \mu M$ de miconazol, se redujeron las corrientes activadas por voltaje en un $40.7 \pm 1.33\%$.

Además, encontramos que el miconazol a diferentes concentraciones del orden micro molar, es capaz de reducir la viabilidad celular de las células HEK transfectadas con los canales iónicos mencionados anteriormente.

Por último, es importante señalar que el miconazol es un fármaco que fue aprobado por la FDA en 1974, y que ha pasado todas las pruebas de seguridad. Por lo que reposicionar a esta molécula como un posible tratamiento contra tumores que tengan sobreexpresados a los canales iónicos $K_v10.1$ y $Na_v1.7$ pareciera ser viable.

5. Introducción

En el último siglo, la farmacología en conjunto con la química y la medicina han contribuido de forma significativa a que el tratamiento de diversas enfermedades sea más eficiente (Brunton et al., 2012). El concepto actual de fármaco se define como una sustancia química de estructura conocida y que es capaz de producir un efecto biológico cuando es administrado a un ser vivo (Flower et al., 2020). El efecto farmacológico de algún compuesto está mediado por la misma naturaleza química del compuesto, y su afinidad por interactuar con alguna o con múltiples estructuras del organismo (receptores). No obstante, esto no fue siempre así, las primeras observaciones acerca del poder curativo de compuestos de origen natural, principalmente obtenidos con la ingesta de plantas, carecían totalmente del conocimiento sobre la estructura y los mecanismos de acción.

5.1. Blancos farmacológicos y sus aplicaciones clínicas

Se denominan “dianas o blancos farmacológicos”, o simplemente “dianas”, a las moléculas de unión de un fármaco, ya sean componentes celulares/tisulares específicos que tras su unión darán lugar a un cambio fisiológico (Flower et al., 2020). Las dianas farmacológicas pueden ser proteínas localizadas en el interior celular o en la superficie membranal celular. En general, son tres los tipos de proteínas que actúan como diana farmacológica:

1. Receptores y canales iónicos
2. Enzimas
3. Transportadores

Por lo regular, los fármacos se unen sólo a determinadas moléculas diana, y cada tipo de molécula diana reconoce únicamente a determinados tipos de fármacos, por lo que se dice que existe una *especificidad recíproca*. Sin embargo, ningún fármaco tiene una acción totalmente específica ni actúa con una especificidad absoluta (Pandey & Balekar, 2018), dando así la aparición de efectos secundarios adversos, de los que ningún fármaco está exento.

Anteriormente, se presentaba la dificultad de realizar ensayos farmacológicos que midieran la interacción de la molécula de manera directa, únicamente existían ensayos por métodos indirectos, ya sea *in vitro* o *in vivo*, en los que, a pesar de las limitantes, eran lo suficientemente buenos como para aplicaciones clínicas (Moffat et al., 2017). Actualmente es posible marcar radiactivamente a los fármacos para estudiar de manera directa la unión del fármaco a los receptores, o bien, por medio de técnicas de imagen no invasivas (por ejemplo, PET: tomografía por emisión de positrones) es posible

estudiar la distribución de los receptores en estructuras como el cerebro humano vivo (Uhl et al., 2015).

En los últimos años, la identificación de nuevos blancos farmacológicos en diversas patologías ha desencadenado la búsqueda de nuevos compuestos químicos con potenciales aplicaciones clínicas (Santos et al., 2016). Para ello se han identificado alrededor de 2759 moléculas pequeñas aprobadas (hasta noviembre del 2023) para determinados blancos farmacológicos humanos según la base de datos de *DrugBank*, que coincide con otras como *Therapeutic Targets Database*, *SuperTarget*, *International Union of Basic and Clinical Pharmacology and British Pharmacological Society* (IUPHAR/BPS), de los cuales aproximadamente el 18% tiene como diana a los canales iónicos en células humanas (Santos et al., 2016).

Resulta de gran importancia el desarrollo de nuevas investigaciones farmacológicas sobre las interacciones entre la molécula de interés y el receptor celular, que en este caso se trata de los canales iónicos, para el tratamiento de patologías asociadas a mutaciones o alteraciones en la expresión de estas proteínas (Hutchings et al., 2018). Descubrir las dianas y los mecanismos de funcionamiento de las moléculas pequeñas suele ser el paso más desafiante y lento para las investigaciones y las aplicaciones clínicas, para ello se han desarrollado muchos enfoques nuevos basados en tecnologías genómicas, proteómicas, bioinformáticas, y de fluorescencia y electrofisiología automatizada de alto desempeño (Jung & Kwon, 2015).

5.2. Canales Iónicos

Los canales iónicos son una familia de proteínas integrales expresadas en las membranas celulares de todos los mamíferos, las cuales permiten el paso selectivo de iones como el Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- . Estas proteínas pueden estar constituidas como homo o heteroligómeros de iguales/distintas subunidades, respectivamente; o bien, como una única cadena polipeptídica organizada en motivos repetidos. En este último caso, cada motivo repetido es funcionalmente equivalente a una subunidad. (Purves, 2020). A su vez, algunos canales iónicos contienen una o más subunidades α que forman un poro central y, por otro lado, algunos canales iónicos contienen subunidades auxiliares β o γ que modulan la actividad de estos, la expresión del canal y la localización en la membrana (Purves, 2020). En el caso del cuerpo humano, existen alrededor de 400 genes de codifican para canales iónicos, los cuales equivalen entre el 2 y el 3% del total del genoma humano (Bell et al., 2023). El flujo de iones a través de los canales tiene múltiples funciones, entre las cuales está el equilibrio osmótico de la célula, la excitabilidad celular, la transducción de señales y es esencial para el mantenimiento del potencial de membrana en reposo, esta última una propiedad bioeléctrica presente en todas las células (Voet et al., 2016). El gradiente electroquímico de cada ion determinará qué dirección siguen: eflujo o saliente (del medio intracelular al extracelular) o influjo o entrante (del medio extracelular al intracelular). La distribución asimétrica de iones y la

naturaleza semipermeable de la membrana a éstos genera una separación de cargas que determina el *potencial de membrana en reposo* o simplemente *potencial de reposo* (Purves, 2020). En situación de reposo, en células excitables la membrana es más permeable a iones de potasio que a iones de sodio (aproximadamente 1000 veces más), por lo que el potencial de reposo está cerca del potencial de equilibrio del potasio, entre los -90 y los -40 mV (Voet et al., 2016). Con base a los estímulos que los activan, existen tres grupos principales de canales iónicos: los *canales iónicos activados por estímulos físicos*, por *ligandos químicos* y los *activados por voltaje*. En condiciones de reposo, la mayoría de los canales se encuentran en un estado conformacional no conductor o cerrado, y la transición del estado cerrado al estado abierto (conductor) de un canal, producido por un estímulo adecuado, se conoce como apertura.

Todas las células del cuerpo humano poseen una población heterogénea de canales iónicos, los cuales participan en múltiples procesos celulares. Las canalopatías son enfermedades que se desarrollan debido a defectos en los canales iónicos, originados por factores genéticos o adquiridos (Kim, 2014). Las mutaciones en los genes que codifican estos canales, las cuales afectan su funcionamiento, son la causa más común de las canalopatías. El avance de las técnicas de biología molecular en conjunto con los estudios genéticos hizo posible identificar que diversas patologías humanas tienen su origen en la función anómala de canales iónicos. Desde la primera descripción, a principios de 1990, de una patología muscular originada por una mutación en un canal de sodio dependiente de voltaje (Kim, 2014) el número de canalopatías se ha incrementado exponencialmente (Fig. 1).

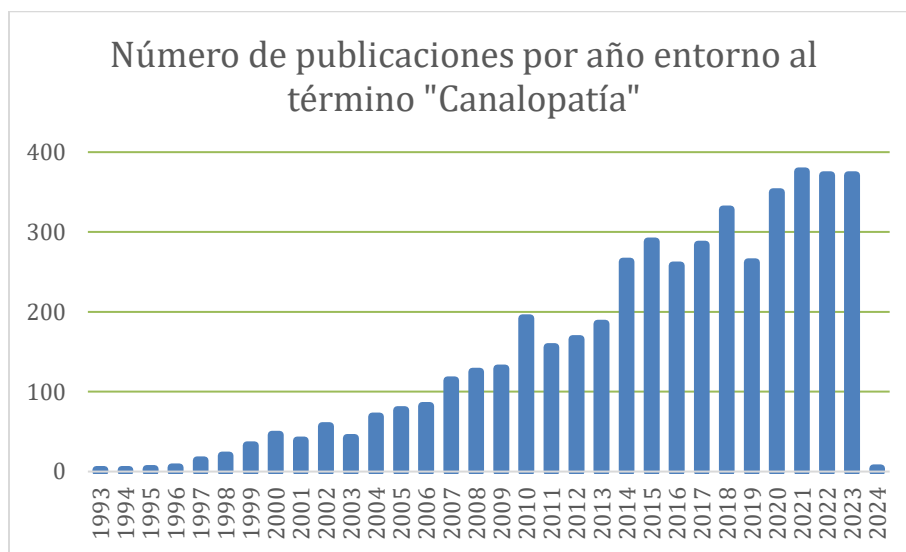


Figura 1. Histograma de crecimiento de publicaciones referentes a canalopatías. La búsqueda se realizó en PUBMED con la palabra clave “*Channelopathies*” y, como se puede observar, el número de publicaciones se ha ido incrementando exponencialmente desde las primeras publicaciones en la década de 1990, con un total de 4305 hasta noviembre del 2023.

De igual forma, el crecimiento sobre el estudio de canales iónicos ha crecido exponencialmente, y en la última década el promedio de publicaciones anuales ronda los 1000 artículos, lo que denota su interés terapéutico.

5.2.1. Ensayos Electrofisiológicos

La electrofisiología comprende el estudio de las propiedades bioeléctricas de células, tejidos y órganos. El poder de esta técnica es tal que permite el estudio de la actividad de canales iónicos individuales en células aisladas hasta la actividad eléctrica de órganos enteros como el corazón o el cerebro. Existen diferentes técnicas que permiten el registro eléctrico a escalas tisulares, como lo es la electroencefalografía (actividad eléctrica del cerebro), la electrocardiografía (actividad eléctrica del corazón) o el electrorretinograma (actividad eléctrica del ojo), entre otras. O bien, a escala celular, entre ellas el *patch-clamp*.

A nivel celular, la técnica de *patch-clamp* permite estudiar las corrientes iónicas (flujo de iones) generadas por canales iónicos en células individuales (Dallas & Bell, 2020) que fluyen del medio extracelular al intracelular, o bien, del intracelular al extracelular. Esta técnica permite adquirir registros de señales eléctricas con electrodos finos (constituidos por un filamento de un material conductor como el cloruro de plata dentro de una pipeta de vidrio llena de solución electrolítica) que atraviesan a una célula bañada por una solución extracelular electrolítica con características similares a las fisiológicas (Fig. 2) (Covey & Carter, 2015). El electrodo tiene dos funciones principales: adquirir señales eléctricas, así como enviar pulsos eléctricos a la célula perforada; esta dualidad del electrodo le vuelve un sistema de retroalimentación, es decir, a partir de los cambios en la señal detectada, es que se envía una señal de retroalimentación para mantener el potencial fijo (fijación de voltaje) o la corriente fija (fijación de corriente).

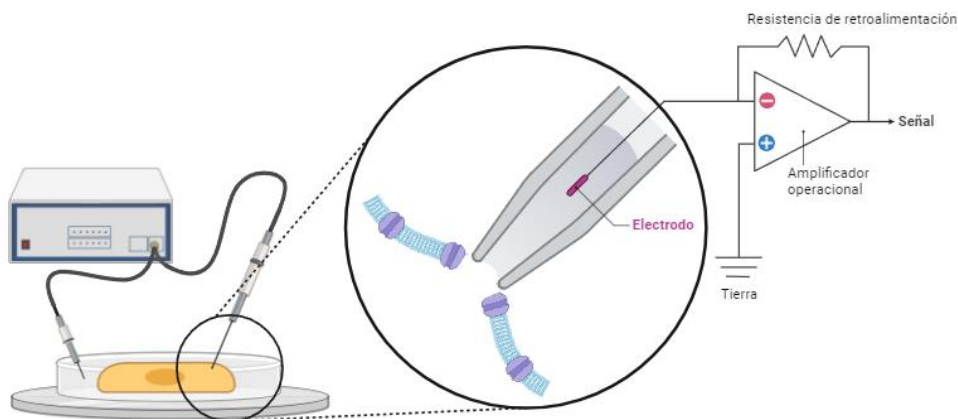


Figura 2. Ilustración de la técnica *Patch-Clamp* de Célula Completa. Imagen creada en BioRender.

Por lo tanto, la técnica de *patch-clamp* es la forma más directa de estudiar canales iónicos bajo condiciones bien definidas: estado basal (sin estímulo), en presencia de un fármaco o compuesto de interés, bajo un estímulo (pH, temperatura, voltaje, entre otros), o bien, estudiar la comunicación celular que se da entre 2 o más células (Purves, 2020). Actualmente es utilizada debido a su bajo costo comparada con otras técnicas electrofisiológicas, así como su versatilidad y adaptabilidad en diferentes laboratorios; además, existen sistemas automatizados que permiten realizar el registro de manera rápida y eficiente (Gao et al., 2021), aunque el estándar de oro sigue siendo el *patch-clamp* manual.

5.2.2. Ensayos de fluorescencia de alto desempeño para canales iónicos

Los canales iónicos se han considerado de importancia para la industria farmacéutica debido a su relevancia para una amplia gama de trastornos en las áreas cardiovascular, inflamatoria y del sistema nervioso central (SNC) (Kaczorowski et al., 2008). Tradicionalmente, la técnica de *Patch-Clamp* se considera como el estándar de oro para el estudio de los canales iónicos (Baxter et al., 2002), seguido por el marcaje radioactivo con isótopos como $^{22}\text{Na}^+$, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ y $^{86}\text{Rb}^+$ (Yu et al., 2015) para el estudio de las propiedades farmacológicas de canales de sodio, calcio y potasio (Gill et al., 2003). Sin embargo, su poca eficiencia hace que se descarten para la búsqueda rápida de nuevos moduladores de su actividad. En años recientes, tanto el uso de ensayos funcionales (electrofisiológicos y no electrofisiológicos) así como la implementación de nuevos equipos (diseñados para estos experimentos) han permitido el desarrollo de *ensayos celulares de alto desempeño* (*High-throughput screenings*) en poblaciones celulares homogéneas, como por ejemplo líneas celulares con la expresión estable de canales iónicos, lo que ha permitido la búsqueda más eficiente de moléculas con efecto sobre canales iónicos (Yu et al., 2016). El término de *ensayos de alto desempeño* hace referencia a aquellos ensayos que permiten la adquisición de múltiples registros a la vez, los cuales pueden ser ópticos (como los ensayos de fluorescencia).

Entre los ensayos funcionales “no electrofisiológicos” implementados en ensayos de alto rendimiento están los basados en fluorescencia. La fluorescencia es la propiedad de algunos átomos y moléculas de absorber luz a una longitud de onda determinada (excitación) y de emitir luz de corta duración a una longitud de onda más larga (González & Maher, 2002).

Los ensayos de fluorescencia requieren una fuente de luz externa para excitar la muestra a una longitud de onda particular. Cuando se excita a la longitud de onda adecuada, la molécula pasa de un estado basal (es decir, cuya energía es mínima) a otro excitado. A medida que la molécula vuelve al estado energético original, se libera energía no ionizante en forma de luz a una longitud de onda mayor (González & Maher, 2002).

Los métodos basados en fluorescencia no miden directamente la corriente iónica (iones pasando a través de un canal o conjunto de canales), sino que miden cambios en la

intensidad de fluorescencia que están asociados a cambios en el potencial de membrana o cambios en la concentración de algún ion (de moléculas fluorescentes cargados en el citosol o la membrana celular) como resultado de la apertura o cierre de algún canal iónico (Yu et al, 2016). Estos ensayos miden de manera homogénea los cambios en fluorescencia de una población celular, por lo que son relativamente fáciles de configurar y lograr un alto rendimiento. Hasta la fecha, los indicadores fluorescentes más usados y con un mejor desempeño para estudiar cambios en la concentración de un ion son los diseñados para sensar calcio intracelular (p.ej. fura-2 o fluo-4), los cuales pueden ingresar a la célula a través de diversos canales iónicos permeables a éste. Estos sensores muestran resultados robustos tanto en ensayos con células independientes en cultivo, así como en experimentos de alto desempeño. Existen otros fluoróforos diseñados para medir el movimiento de otros cationes, sin embargo, la razón intensidad/ruido no es buena, por lo tanto, su uso no es tan distribuido. No obstante, el movimiento de iones puede producir otros efectos a nivel celular que pueden ser medidos a través de ensayos de fluorescencia, entre ellos el potencial de membrana.

Los indicadores fluorescentes especializados en detectar cambios en el potencial de membrana basan su mecanismo de acción en la acumulación y redistribución del sensor fluorescente en la membrana celular de una forma dependiente del voltaje, es decir, el fluoróforo puede estar embebido en la cara externa o interna de la membrana celular dependiendo si el potencial de membrana está despolarizado o hiperpolarizado, y en función de esta distribución hacer que la intensidad de fluorescencia sea mayor o menor. Debido a que la apertura y cierre de canales iónicos, en una población homogénea de células, puede impactar drásticamente en el potencial de membrana, estos métodos son considerados una medición indirecta de la actividad de un canal iónico de interés. Dentro de los ensayos de fluorescencia de alto rendimiento, destacan los kits comerciales conocidos como FLIPR® (Fluorometric Imaging Plate Reader), de la empresa Molecular Devices, el cual permite estudiar la actividad de un canal iónico a través de incrementos o descensos en la señal de fluorescencia debidos a cambios en el potencial de membrana o la actividad de canales de K^+ a través del movimiento de iones poco comunes como el talio (Tl^+). En la figura 3 se observa el funcionamiento del kit de FLIPR®, en reposo el fluoróforo (indicado con círculos naranja) que tiene una carga negativa se encuentra distribuido principalmente en la cara externa de la membrana celular, donde la mayor parte de la fluorescencia es apagada por una “máscara” (semicírculos verdes), sin embargo, cuando el potencial de membrana es despolarizado por un estímulo (por ejemplo con una alta concentración de potasio) existe una redistribución de cargas haciendo el interior más positivo, debido a un efecto electrostático el fluoróforo tiende a redistribuirse en la cara interna de la membrana donde queda libre de su “máscara” y por tanto la señal fluorescente tiende a incrementarse. Cuando la membrana se hiperpolariza, el fluoróforo se concentra en la cara externa de la membrana donde la “máscara” hace que la señal fluorescente disminuya (Fig. 3).

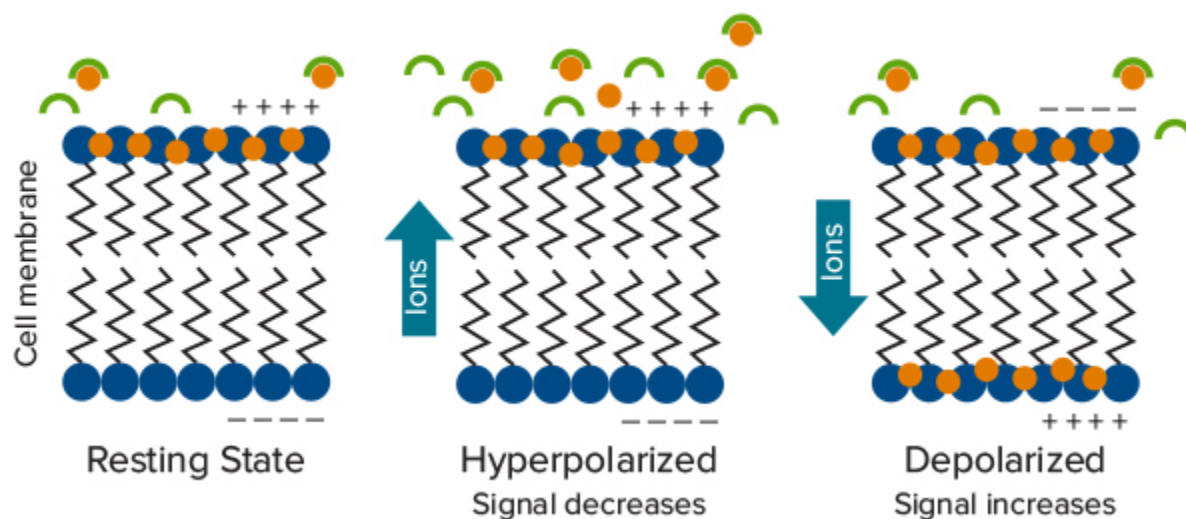


Figura 3. Esquema que muestra el funcionamiento general del fluoróforo sensor de cambios del potencial de membrana presente en el kit FLIPR®. Tomado de la página de Molecular Devices: <https://es.moleculardevices.com/products/assay-kits/ion-channel/flipr-membrane-potential#Technology>

5.3. Los canales iónicos son blancos de moléculas pequeñas

Para que un blanco farmacológico sea considerado como tal, éste debe tener uno o varios sitios de unión a moléculas (como fármacos) que puedan producir un efecto terapéutico, dicho sitio de unión debe exhibir cierto grado de afinidad y selectividad por la molécula de interés (Goodman & Gilman, 2017). La accesibilidad de sus sitios de acción también es un punto crítico. En el caso de los canales iónicos, estos suelen tener diversos sitios alostéricos de modulación; además, que la mayoría que los canales sean proteínas de membrana hace que los sitios para modularlos sean más accesibles, tanto para moléculas pequeñas u otras estructuras moleculares más grandes (anticuerpos o péptidos).

Las moléculas pequeñas usualmente se derivan a partir de síntesis química y típicamente tienen una masa menor a 1 kDa (Goodman & Gilman, 2017) (Chhabra, 2021). Debido a esta propiedad suelen ser modificadores alostéricos efectivos de diversas proteínas, ya sea extracelulares o intracelulares. La aproximación más clásica para el uso de moléculas pequeñas es la síntesis y tamizaje de una colección (librería) de moléculas con características particulares o relacionadas con alguna molécula orgánica que participe en algún fenómeno biológico de interés.

Por otro lado, los ensayos de fluorescencia de alto desempeño son una técnica que permite identificar moléculas pequeñas que puedan unirse a canales iónicos dependientes de voltaje (Gómez-Herrera et al., 2023; Loza-Huerta et al., 2021), los cuales participan en diversas patologías, como por ejemplo el canal $K_v10.1$ implicado en cáncer (Luis et al., 2022), o el $Na_v1.7$ en dolor crónico (Hameed, 2019). Además, alguna de estas moléculas pequeñas se ha registrado que tienen efecto en otros canales

iónicos, como es el caso de miconazol y su efecto modulador del canal $K_v11.1$, compuesto en el que se centra el interés de esta tesis y su efecto sobre los canales iónicos $K_v10.1$ y $Na_v1.7$.

5.4. Los canales iónicos $K_v10.1$ y $Na_v1.7$

Entre los diversos tipos de canales iónicos, $K_v10.1$ y $Na_v1.7$ son de interés debido a sus propiedades funcionales únicas y sus implicaciones en la salud, así como su papel en procesos fisiopatológicos, como se describe a continuación.

5.4.1 El canal de potasio $K_v10.1$

Estructura y expresión.

$K_v10.1$, también conocido como $Eag1$, en humanos es codificado por el gen $KCNH1$, el cual es un canal de potasio dependiente de voltaje. En mamíferos adultos, la expresión de $K_v10.1$ se limita principalmente al sistema nervioso, en áreas como el bulbo olfatorio, la corteza cerebral, el hipocampo y el cerebelo de humanos y ratas adultas. Aunque se encuentra en diversas regiones cerebrales en roedores y humanos, su función fisiológica aún no se comprende completamente. En tejido sano, el $K_v10.1$ se detecta en el sistema nervioso central, donde participa en la regulación de la excitabilidad ante estimulación repetida de alta frecuencia (Cázares-Ordoñez & Pardo, 2017), así como en músculo esquelético (Occhiodoro et al., 1998) y en células troncales mesenquimales (Mareschi et al., 2006). En contraste, $K_v10.1$ se expresa de manera robusta en más del 70 % de los tumores humanos, donde su expresión parece estar controlada por reguladores clave de la proliferación y supervivencia, como $p53$ y $E2F1$, a menudo alterados en el cáncer. $K_v10.1$ al ser un canal oncogénico altera las propiedades de las células en donde se sobreexpresa, aumentando la proliferación celular, la supervivencia, la angiogénesis, la migración y la invasión, características de un fenotipo tumoral agresivo. (Ouadid-Ahidouch et al., 2016; Luis et al., 2022).

Comprender el comportamiento y la modulación de este canal es de gran importancia, ya que juega un papel importante en el cáncer; modular su actividad y los procesos celulares en los que participa (como viabilidad, proliferación, entre otros), da pauta a nuevas terapias dirigidas para el tratamiento contra el cáncer.

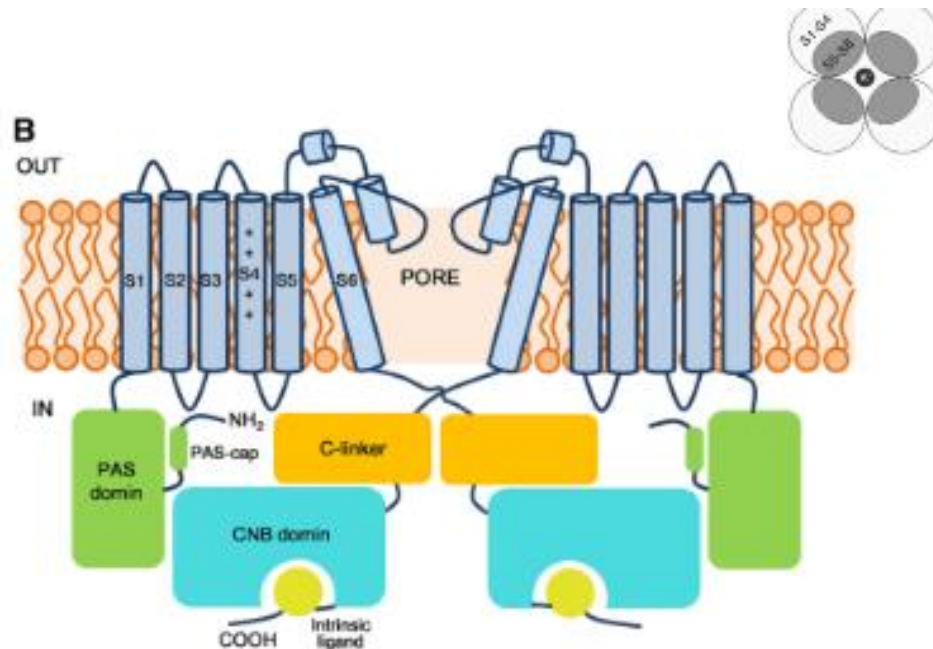


Figura 4. Esquema del canal Kv10.1. En azul se representan los dominios homólogos de unión a nucleótidos cíclicos, en verde el dominio Per-ARNT-Sim (PAS), en amarillo el dominio C-enlazador y en gris los segmentos transmembranales S1 a S6. En la esquina superior derecha se observa el ensamblaje del canal funcional que es homotetramérico. Tomada de Wang et al., 2017

Este canal está ensamblado en la membrana celular como homotetrámero. Cada subunidad consta de seis segmentos transmembranales, de los cuales los segmentos S1 al segmento S4 constituyen el *dominio sensor de voltaje*, mientras que los segmentos S5 y S6 forman parte del *dominio formador de poro*, con los extremos N- y C- terminal localizándose intracelularmente. Este canal a su vez consta de un asa P que contiene el filtro de selectividad formado por el motivo TVGYG, que les otorga la selectividad a iones de potasio (Pozdnyakov et al., 2020). Existen tres dominios intracelulares: un dominio Per-ARNT-Sim (PAS) ubicado en el extremo N-terminal que está asociado con la detección de oxígeno y la activación del factor inducible por hipoxia (HIF); un dominio C-enlazador; y un dominio homólogo de unión a nucleótidos cíclicos (CNBHD). En la región extracelular, se ubica una región *torreta*, esta región cuenta con dos sitios de glicosilación y uno formador de hélice, el cual se posiciona de manera paralela a la membrana interactuando con el segmento S6; esta posición de la cadena de azúcares rodea la abertura del poro formando un impedimento estérico que previene la unión de toxinas con el canal (Toplak et al., 2021).

Biofísica y farmacología.

Los canales Kv10.1 muestran una cinética de activación lenta y no presentan inactivación (Whicher & MacKinnon, 2016), lo que los distingue de otros canales de potasio. A su vez, el potencial medio de activación es alrededor de +8 mV (Kortüm et al., 2015). Una característica de este canal es su tasa de activación, que es directamente proporcional

al potencial de fijación antes del pulso despolarizante, entre más despolarizado es el voltaje de fijación, la tasa de activación es más rápida (Baucer C. K. & Schwarz J. R., 2001).

Farmacológicamente, los canales $K_v10.1$ pueden ser modulados por una variedad de compuestos. Los bloqueadores de $K_v10.1$ incluyen astemizol y terfenadina (típicamente conocidos como antihistamínicos), e imipramina (antidepresivo), entre otros. Estos bloqueadores pueden inhibir la actividad del canal, lo que abre el camino a posibles aplicaciones terapéuticas en el tratamiento del cáncer. Además, los canales $K_v10.1$ pueden regularse mediante vías de señalización intracelular, como las proteínas quinasas, que pueden modular la actividad del canal a través de eventos de fosforilación (Brüggemann et al., 1993).

Función en la salud y en cáncer

El canal $K_v10.1$ posee diferentes papeles fisiológicos en diferentes tejidos en los que se encuentre expresado. Este canal contribuye a la fase de repolarización de potenciales de acción en neuronas, ayudando a regular el potencial de membrana facilitando el eflujo de iones de potasio y, por tanto, ayuda en la restauración del estado de reposo de las neuronas después de la despolarización (Ouadid-Ahidouch et al., 2016). Por lo mismo, desempeña un papel en el control de la excitabilidad neuronal, así como en el desarrollo de neuronas y como protector ante factores de estrés.

El desarrollo del cáncer es un proceso de múltiples etapas que implican la alteración funcional de numerosas proteínas con roles clave en la proliferación celular, apoptosis y diferenciación (Prevarskaya et al., 2018). Las alteraciones en la expresión de los canales iónicos están involucradas en la progresión y fisiopatología de diversos tipos de cáncer humano (Prevarskaya et al., 2018). La participación de los canales iónicos en el cáncer son diversos y contribuyen a la proliferación celular, migración celular, control del volumen celular y apoptosis (Cázares-Ordoñez & Pardo, 2017). Desde 1980, se ha descrito evidencia sobre la actividad de los canales de potasio en la mitogénesis en linfocitos T humanos (DeCoursey et al., 1984). Desde entonces, diversos estudios han encontrado una relación entre los canales iónicos y el crecimiento tumoral, lo que representa hallazgos importantes en la biología del cáncer. En particular, $K_v10.1$ se considera un canal iónico clínicamente relevante debido a su actividad transformadora y su expresión ectópica en tumores clínicos. Otros estudios revelaron la sobreexpresión de $K_v10.1$ en tumores de muestras clínicas, lo que indica que puede representar un objetivo oncológico prometedor. De hecho, la expresión de $K_v10.1$ puede ser útil como marcador potencial de displasia cervical y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, y también se correlaciona con un mal pronóstico en sarcoma, cáncer de colon, carcinoma de ovario, leucemia mieloide aguda, glioblastoma multiforme y metástasis cerebrales, demostrando un valor predictivo para el resultado (Martínez et al., 2015). Las metástasis cerebrales son una malignidad particularmente importante porque son

consecuencia de la invasión de células cancerosas desde tumores formados en diversos órganos.

5.4.2 El canal de sodio Nav1.7

Estructura y expresión

El Nav1.7, en humanos es un canal codificado por el gen SCN9A, el cual es permeable a sodio activado por voltaje que se expresa predominantemente en el sistema nervioso periférico, donde juega un papel fundamental en la generación y propagación de potenciales de acción en las neuronas nociceptivas, las cuales detectan estímulos nocivos (McDermott et al., 2019). La disfunción de Nav1.7 se ha relacionado con trastornos de dolor hereditarios, como la insensibilidad congénita al dolor, así como con afecciones de dolor crónico (McDermott et al., 2019). Comprender los mecanismos subyacentes a la modulación de Nav1.7 puede proporcionar información valiosa para el desarrollo de nuevas estrategias analgésicas dirigidas a este canal. Este canal, consiste en una gran subunidad α , que forma la principal región de formación del poro del canal, junto con subunidades β asociadas que modulan su función. La subunidad α se compone de cuatro dominios homólogos (I a IV), cada uno de los cuales contiene seis segmentos transmembrana (S1-S6). Los segmentos S4 actúan como sensores de voltaje, respondiendo a los cambios en el potencial de la membrana e iniciando la activación del canal. Dentro de cada dominio, hay varias características estructurales críticas. Los segmentos S5 y S6 de cada dominio se unen para formar el poro selectivo de iones. Estos segmentos están unidos por un bucle de poro, conocido como asa P, el cual contiene el motivo DEKA que contribuye a la selectividad y permeabilidad de los iones de sodio en el filtro de selectividad (Shen et al., 2019). La región enlazadora S4-S5, también conocida como enlazador del dominio III-IV, juega un papel crucial en la inactivación rápida del canal, lo que permite que el canal entre rápidamente en un estado no conductivo tras la despolarización.

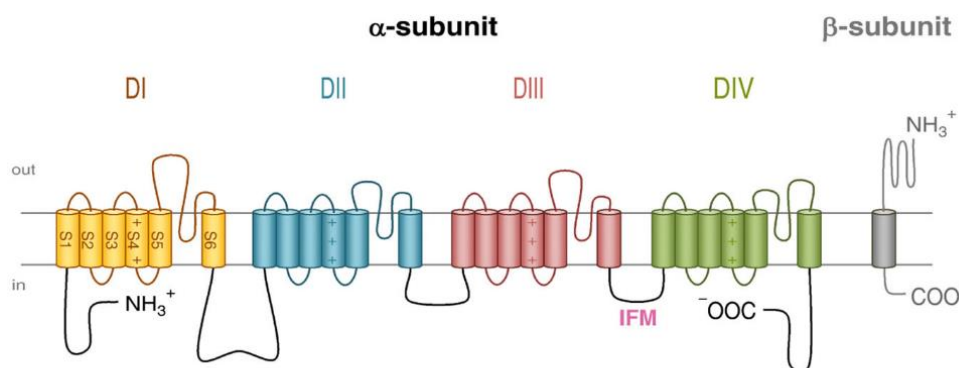


Figura 5. Esquema del canal Nav1.7. Este canal consiste de una única cadena polipeptídica, la subunidad α , la cual se pliega en cuatro repeticiones homólogas (DI a DIV) en colores amarillo, azul, rojo y verde. Cada una de las cuales contiene seis hélices transmembrana denominadas S1 a S6.

Biofísica y farmacología

Desde el punto de vista biofísico, el canal iónico Nav1.7 exhiben una cinética de activación e inactivación rápida, lo que permite una rápida despolarización del potencial de membrana para la generación y propagación de los potenciales de acción en los nociceptores que se encuentra expresado (Minett et al., 2014). Presentan activación dependiente de voltaje, con un voltaje medio de activación alrededor de los -40 mV (Chatelier et al., 2008).

Farmacológicamente, los canales Nav1.7 pueden ser modulados por una variedad de compuestos. Se han identificado numerosas moléculas pequeñas, péptidos y toxinas como moduladores de Nav1.7. Los ejemplos incluyen tetrodotoxina (TTX), que actúa como un potente bloqueador del canal Nav1.7 con una IC50 de 2 nM y antagonistas específicos de Nav1.7 como PF-05089771 y CNV1014802 (Dekermendjian, 2008). Estos moduladores farmacológicos brindan herramientas valiosas para estudiar el papel de Nav1.7 en el procesamiento del dolor y las posibles intervenciones terapéuticas para los trastornos del dolor (Eagles et al., 2020).

Las mutaciones en el gen que codifica para Nav1.7, SCN9A, se han asociado con diversos trastornos del dolor, lo que destaca la importancia clínica de comprender las propiedades biofísicas y farmacológicas de Nav1.7. Las mutaciones hereditarias de ganancia de función en Nav1.7 pueden conducir a condiciones como la eritromelalgia hereditaria y el trastorno de dolor extremo paroxístico, caracterizado por una mayor sensibilidad al dolor. Por el contrario, las mutaciones de pérdida de función en Nav1.7 pueden dar como resultado una insensibilidad congénita al dolor, donde las personas afectadas tienen una capacidad reducida para percibir el dolor (Fischer & Waxman, 2010).

Funciones en la salud y en el cáncer

En el contexto del cáncer, se ha observado que la sobreexpresión de Nav1.7 puede estar asociada con la progresión tumoral y la metástasis en varios tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama, de colon y de próstata (Diss et al., 2005). Se ha sugerido que la actividad de Nav1.7 puede promover la invasión y migración celular, así como la formación de nuevos vasos sanguíneos que nutren a los tumores (angiogénesis) (Angus & Ruben, 2019).

La inhibición selectiva de Nav1.7 se ha propuesto como una estrategia terapéutica potencial para el tratamiento del cáncer, ya que podría reducir la capacidad invasiva y metastásica de las células tumorales (Pukkanasut et al., 2023). Sin embargo, aún se necesitan más investigaciones para comprender completamente el papel de Nav1.7 en la progresión del cáncer y para desarrollar terapias efectivas que se dirijan a este canal iónico de manera segura y selectiva.

5.5. El colesterol y los canales iónicos

El colesterol, un lípido con notoria implicación en procesos asociados a síndromes metabólicos y enfermedades cardiovasculares, como la aterosclerosis, lo que ha hecho que adquiriera una reputación desfavorable en los últimos años (Voet et al., 2016). No obstante, su papel crucial en las membranas plasmáticas de mamíferos destaca su importancia, representando típicamente el 30% de los lípidos membranales. La polaridad conferida por su grupo OH otorga un carácter anfifílico, mientras que la rigidez adicional, en comparación con otros lípidos de membrana, se deriva de su sistema de anillo fusionado (Voet et al., 2016). Aunque las plantas presentan niveles bajos de colesterol, son capaces de sintetizar esteroides alternativos. Levaduras y hongos también sintetizan esteroides con variaciones en las cadenas laterales alifáticas y la cantidad de enlaces dobles con respecto al colesterol. En el contexto de los mamíferos, el colesterol emerge como el precursor metabólico de las hormonas esteroideas, moléculas reguladoras de diversas funciones fisiológicas, abarcando aspectos sexuales, suprarrenales, metabólicos, entre otros (Rodríguez et al., 2007). Si bien el colesterol otorga estabilidad a la membrana celular, también se ha estudiado sus interacciones con los componentes membranales como lo son otros lípidos y proteínas, entre ellas, a los canales iónicos.

El primer motivo propuesto para la asociación del colesterol con las proteínas transmembrana es el denominado *Motivo de Consenso de Aminoácidos para el Reconocimiento de Colesterol* (CRAC, por sus siglas en inglés). Este motivo se caracteriza por una secuencia vagamente definida de aminoácidos: ((L/V)-X1-5-(Y)-X1-5-(K/R)), donde "X" representa cualquier aminoácido. Posteriormente, se amplió la familia de motivos de unión al colesterol a la secuencia inversa, conocida como CARC ((K/R)-X1-5-(Y/F)-X1-5-(L/V)), que parece ser más favorable desde el punto de vista energético para la unión del colesterol en los canales iónicos (Zákány et al., 2019). En contraste con los dos anteriores, el tercer *Motivo de Consenso sobre el Colesterol* (CCM) se localiza en presencia de subunidades vecinas, donde (K/R)(I/L/V)(W/Y) se encuentra en una hélice y (F/Y/W) en una hélice adyacente. Estos motivos son identificables en numerosas proteínas, como los canales K_v, BK, Kir, NaV1.9, TRPV1, TRPV4, nAChR, ABCG1, ABCG2, y una amplia variedad de receptores acoplados a proteína G. Están ubicados tanto en el dominio transmembrana como en el citoplasmático, y en muchos casos, constituyen los principales determinantes de los efectos del colesterol en una proteína específica (Zákány et al., 2019). En los tres motivos mencionados, existe una característica compartida: la capacidad de los aminoácidos para interactuar con el colesterol a través de diferentes interacciones, como hidrofóbicas, donde el grupo alquilo del colesterol se asocia con isoleucina, leucina y valina en el motivo. También se observan enlaces de hidrógeno, donde el grupo hidroxilo del colesterol establece conexiones con arginina y lisina, que poseen cargas positivas. Además, se destacan interacciones de apilamiento, que se producen entre el anillo de colesterol y aminoácidos hidrofóbicos aromáticos presentes en el motivo.

En general, los efectos del colesterol inhiben las funciones de los canales K_v (Zákány et al., 2020). Se ha demostrado que tanto el enriquecimiento como el agotamiento (depleción) del colesterol alteran la cinética de activación e inactivación dependiente de voltaje de los canales, y las constantes de tiempo de activación e inactivación para las corrientes de los canales $K_v1.3$, $K_v10.1$, $K_v1.5$ y $K_v2.1$. Además, las curvas de conductancia de los canales $K_v1.3$ y $K_v10.1$ se desplazan hacia la derecha en respuesta a la exposición a colesterol. Este papel modulador del colesterol sobre el canal $K_v10.1$ es importante, ya que moléculas como los azoles (antimicóticos) podrían regular la actividad del canal por medio de la depleción de colesterol de las membranas celulares en las que se encuentran embebidos.

5.5.1 El miconazol y el canal hERG

Los esteroides son componentes vitales de todas las membranas celulares eucariotas y son esenciales para el crecimiento y la viabilidad celular. Ergosterol, el principal esteroide encontrado en las membranas celulares fúngicas, cumple la misma función que el colesterol, el esteroide principal presente en las membranas celulares de mamíferos. Los esteroides desempeñan numerosos roles en las membranas eucariotas, incluyendo el establecimiento de la fluidez adecuada de la membrana, la regulación de enzimas vinculadas a la membrana y el mantenimiento de la permeabilidad de la membrana (Rodríguez et al., 2007). Aunque la vía de biosíntesis de esteroides en hongos y mamíferos es sorprendentemente similar, las diferencias en las etapas posteriores de ambas vías resultan en dos moléculas estructuralmente diferentes. Aunque el colesterol es un análogo estructural del ergosterol, las diferencias en la síntesis y la estructura hacen que los antifúngicos que afectan la síntesis de ergosterol sean selectivos para los hongos y, por lo tanto, útiles en el tratamiento de infecciones fúngicas. La inhibición de la síntesis de ergosterol por antifúngicos como el miconazol, que conduce a la disrupción de la membrana celular fúngica y, eventualmente, a la muerte del hongo (Shafiei et al., 2020).

El miconazol es un fármaco aprobado por la FDA el 8 de enero de 1974 y se utiliza para tratar la candidiasis orofaríngea en adultos y como complemento para la dermatitis del pañal complicada por candidiasis en niños inmunocompetentes de cuatro semanas o más (Pierard et al., 2012). Se presenta en forma de supositorios y crema para el tratamiento de infecciones vaginales por hongos, aliviando la picazón e irritación vulvar relacionada. Además, la crema de miconazol demuestra eficacia en el tratamiento de condiciones como el pie de atleta (tinea pedis), la tiña inguinal (tinea cruris), infecciones por tiña (tinea corporis), pitiriasis (anteriormente tiña) versicolor y candidiasis cutánea (Pierard et al., 2012). Su mecanismo principal de acción consiste en la inhibición de la enzima lanosterol 14-alfa-desmetilasa, lo que resulta en una producción alterada de ergosterol y una composición y permeabilidad alteradas de la membrana celular,

provocando la fuga de cationes, fosfato y proteínas de bajo peso molecular (De Nollin & Borgers, 2009).

En los años recientes, miconazol ha mostrado ser una molécula de interés debido a posibles efectos secundarios tras su aplicación tópica como irritación de la piel y el tejido epitelial de la cavidad bucal y vaginal. Además, Kikuchi y colaboradores (2005) mostraron el efecto inhibitorio de miconazol sobre el canal $K_v11.1$ (hERG), canal expresado en el tejido cardíaco. En este trabajo encontraron que miconazol presenta un efecto inhibitorio dosis-dependiente con una $IC_{50} = 2.1 \mu M$. Sin embargo, debido al alto grado de similitud del canal $K_v11.1$ con el canal oncogénico $K_v10.1$, miconazol es viable para modular la actividad de este canal oncogénico.

6. Antecedentes

El Laboratorio Nacional de Canalopatías tiene interés por encontrar moduladores de diferentes canales iónicos por su relevancia fisiológica y patológica. Resulta prometedor identificar aquellas moléculas ya aprobadas por los distintos organismos internacionales y nacionales, y que pueden afectar los canales iónicos de interés como el canal oncogénico $K_v10.1$ y el nociceptivo $Na_v1.7$. Para ello, hemos utilizado un set de 17 compuestos de los kits exploradores de Alomone Labs que se ha visto tienen efecto sobre otros canales iónicos (<https://www.alomone.com/c/modulator-explorer-kits-ion-channels>) y que es de nuestro interés estudiar si tienen efecto, o no, sobre los canales $K_v10.1$ y $Na_v1.7$ por medio del kit *FLIPR*® de potencial de membrana de Molecular Devices. Los compuestos fueron utilizados a concentraciones altas (ver anexos, tabla 2) para observar el máximo efecto. El procedimiento utilizado es el descrito en la sección de métodos.

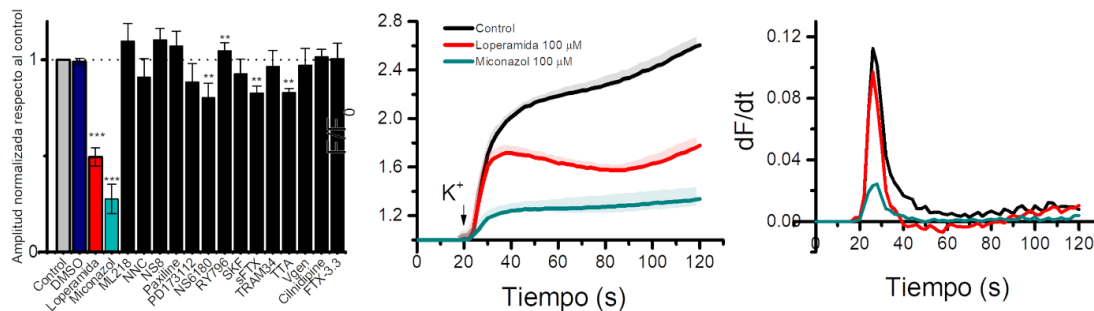


Figura 6. Ensayo de fluorescencia de potencial de membrana. Fluorescencia normalizada de células HEK-Kv10.1 tratadas con los diferentes compuestos. Cada barra está normalizada con respecto a la fluorescencia emitida por células sin tratamiento (F_0). A la izquierda, señales de fluorescencia normalizada de células HEK-Kv10.1. El trazo de fondo representa el error estándar asociado a cada señal. A la derecha, tasa de cambio de la señal de fluorescencia. Como se observa, es más lenta esta tasa en las células tratadas con miconazol.

En la Figura 6, se observan los registros de señal de fluorescencia normalizados con respecto al estado basal (sin estímulo; F/F_0). La línea sólida muestra el promedio de 3 repeticiones realizadas por triplicado y el área sombreada representa el error estándar. Los primeros 20 segundos de los registros representa el estado basal (F_0), pasado este tiempo el equipo adiciona el estímulo de alto potasio y tras su adición hay un aumento de las señales de fluorescencia. Para el análisis estadístico se cuantificó las señales de fluorescencia al final de cada registro ($t = 120$ s) y se normalizó con respecto al valor del control. De esta manera se identificaron aquellos compuestos que tuvieron un efecto sobre las células HEK-Kv10.1 (Tabla 2). Para estos experimentos se utilizó un inhibidor conocido del canal, la loperamida (Loza-Huerta et al., 2021), la cual, como se esperaba,

disminuyó de forma significativa ($P < 0.01$; ANOVA de una vía) la amplitud de las señales de fluorescencia. De entre todos los compuestos ensayados sobre las células HEK-Kv10.1, la molécula miconazol fue de particular interés debido a que redujo la señal de fluorescencia de forma significativa ($P < 0.01$, ANOVA de una vía) (Fig. 7-A) a más del 50.0 %. Además, para estudiar diferencias en la cinética de las señales de cada grupo se obtuvo la primera derivada de cada registro, debido a que nos permite conocer la tasa de cambio con respecto al tiempo de cada señal (Fig. 7); dicho análisis nos permitió cuantificar que el miconazol redujo la tasa máxima de cambio 4.6 veces con respecto a la tasa de cambio de las células control, equivalente al 21.8 %.

Para validar que el Kit FLIPR® de potencial de membrana funcionara como un ensayo para la búsqueda de nuevos compuestos moduladores de canales iónicos sobre cualquier tipo de canal, se probó el Kit en la línea celular HEK-Nav1.7. En ésta se utilizó también miconazol para estudiar su especificidad sobre canales iónicos dependientes de voltaje. Asimismo, se utilizó tetrodotoxina (TTX), el inhibidor clásico de dichos canales.

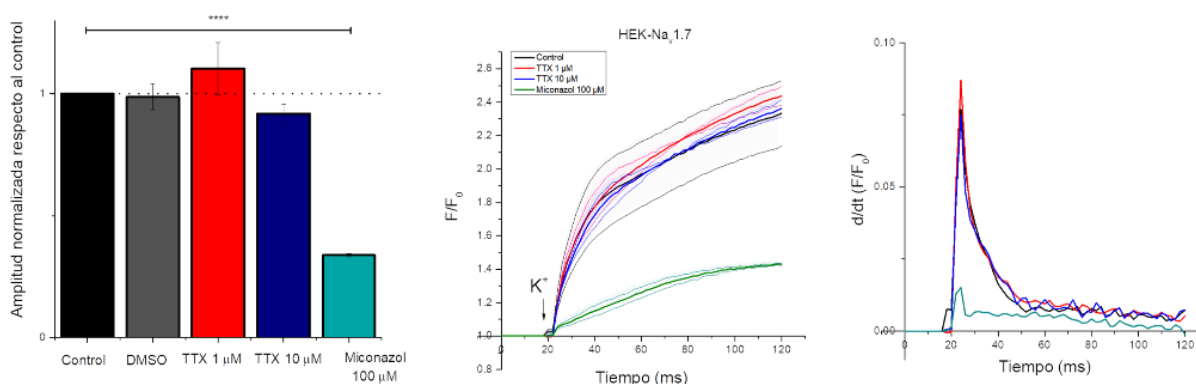


Figura 7. Fluorescencia de potencial de membrana. A la izquierda, señales de fluorescencia normalizada de células HEK-Nav1.7. El trazo de fondo representa el error estándar asociado a cada señal. A la derecha, tasa de cambio de la señal de fluorescencia. La tasa de cambio es más lenta en las células tratadas con miconazol.

Como en las células HEK-Kv10.1, el efecto de miconazol fue evidente sobre la amplitud de las respuestas de fluorescencia comparada con los controles en HEK-Nav1.7.

Sin embargo, no se observaron cambios estadísticamente significativos ($P < 0.01$; ANOVA de una vía) cuando las células fueron preincubadas con TTX 1 y 10 μ M a comparación del control. Se observó un cambio significativo de la señal de fluorescencia de las células preincubadas con miconazol a 100 μ M a comparación de las células control. Experimentos de *patch-clamp* en célula completa en la línea celular HEK-Nav1.7 muestran que el potencial de membrana en reposo de estas células tiene un valor de -4.81 ± 1.89 mV, lo cual indica que el potencial de membrana en reposo ya se encuentra

despolarizado por lo que sería complicado que a partir del estímulo con alto potasio este sea capaz de activar a los canales iónicos $\text{Na}_v1.7$. Es probable que el cambio que se observa en la señal de fluorescencia de las células HEK- $\text{Na}_v1.7$ tratadas con miconazol sea efecto de los canales iónicos de potasio endógenos que expresa el sistema HEK. Por lo tanto, es posible que este kit no sea adecuado para probar compuestos en estas líneas celulares.

Para comparar la inhibición por miconazol en las líneas celulares se muestra la figura 8, en el cual se observa su efecto en el valor final de cada registro comparado con su respectivo control.

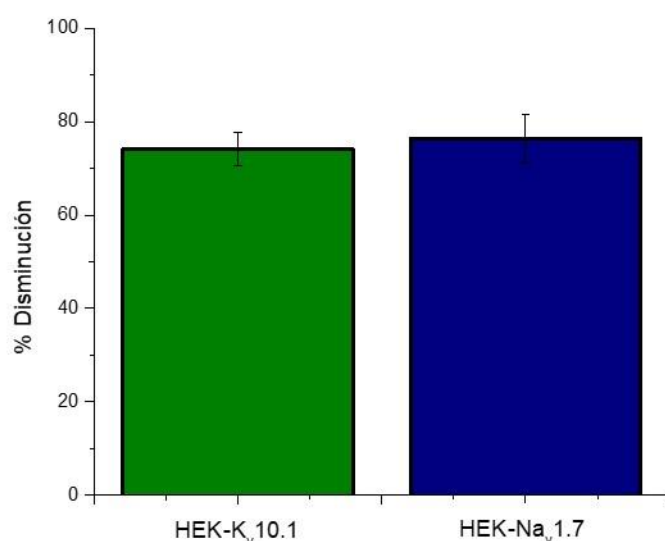


Figura 8. Ensayo de fluorescencia de potencial de membrana. Miconazol inhibe las respuestas de fluorescencia en Kv10.1 y Nav1.7, sin encontrar diferencias significativas entre ambas líneas celulares. Respuestas normalizadas respecto a la respuesta control.

Estos resultados muestran que miconazol tiene un efecto sobre los canales iónicos de interés, estudiar y comprender el mecanismo de acción de este compuesto abre caminos a que se pueda replantear su aplicación clásica como un posible fármaco para el tratamiento de tumores que sobreexpresen a los canales iónicos $\text{K}_v10.1$ y $\text{Na}_v1.7$, como el melanoma. Aunque el efecto del miconazol parece ser inespecífico sobre la línea celular HEK- $\text{Na}_v1.7$, se realizaron experimentos electrofisiológicos donde se encontró que miconazol es capaz de inhibir las corrientes activadas por voltaje de esta línea celular (ver resultados).

Por último, es importante mencionar que los ensayos de fluorescencia de alto desempeño que miden cambios asociados al potencial de membrana presentan grandes limitantes, ya que éstos no evalúan directamente la actividad de los canales iónicos.

Además de que encontramos que no en todos los sistemas de expresión heteróloga de canales iónicos es viable utilizar el kit de FLIPR de potencial de membrana. Sin embargo, una vez estandarizado el kit sobre una línea celular, resulta eficiente como un cribado rápido para probar múltiples compuestos, como es el caso de la línea celular HEK-K_v10.1. Además de que existen otro tipo de kits de ensayos de fluorescencia (como FLIPR de calcio) que tienen un alto potencial para identificar moléculas moduladoras de diversos canales iónicos.

7. Justificación

En los últimos 20 años, los canales iónicos se han convertido en una de las proteínas más estudiadas del cuerpo humano. Una búsqueda rápida en el portal de la Biblioteca Nacional de Medicina de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de los Estados Unidos (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), usando el término “ion channel” muestra que desde el 2006 el promedio de publicaciones es de, aproximadamente, 10 mil artículos por año. Estos datos demuestran la relevancia biomédica y clínica de estas proteínas, las cuales se encuentran presentes en todas las células de nuestro cuerpo participando en todos nuestros procesos celulares. Su presencia, principalmente, en la membrana celular hacen que estos adquieran una notoriedad mayor, debido a que esto facilita el diseño de nuevos compuestos que tengan como sitio de acción alguna región extracelular de estas proteínas, todo esto con un propósito terapéutico. Cabe mencionar que se estima que alrededor del 18% de fármacos disponibles tienen como blanco de acción un canal iónico. No obstante, la mayoría de estos fármacos pueden tener efectos secundarios al ser poco selectivos. De ahí que un objetivo de las grandes empresas farmacéuticas sea el diseño de nuevos compuestos más selectivos.

Habitualmente, los estudios farmacológicos sobre canales iónicos se han realizado en conjunto con técnicas electrofisiológicas, como el *patch-clamp*; sin embargo, presentan desventajas notorias, entre ellas que sólo es posible adquirir el registro de una célula a la vez, lo que vuelve a estas técnicas poco eficientes ya que puede tomar días e incluso semanas adquirir un número de registros necesarios para un análisis estadístico robusto. Por ello, los ensayos de fluorescencia de alto desempeño son una técnica emergente para estudios farmacológicos, debido a su alta resolución temporal y principalmente a que permiten realizar un tamizaje eficiente para la búsqueda de compuestos y moléculas pequeñas con actividad sobre canales iónicos.

Por esta razón, la presente tesis tiene como objetivo el uso primario de ensayos de fluorescencia de alto desempeño para identificación de nuevos compuestos que pueden influir en la actividad (apertura o cierre) de canales iónicos, entre estos se encuentra miconazol, un potente inhibidor del canal $K_v11.1$ que ha generado controversia debido a sus posibles efectos adversos, usando como modelo experimental a la línea celular HEK- $K_v10.1$ Y HEK- $Na_v1.7$. Una vez identificado el efecto, se corroborarán los resultados de fluorescencia con los registros electrofisiológicos mediante la técnica de *patch-clamp*, y se realizarán ensayos de microscopía.

8. Hipótesis

Miconazol tendrá efecto modulador sobre los canales iónicos dependiente de voltaje Kv10.1 y Nav1.7 de manera dosis-dependiente. Este efecto alterará las propiedades funcionales de las células transfectadas con dichos canales.

9. Objetivos

9.1. Objetivo general

Caracterizar mediante ensayos de fluorescencia de alto rendimiento, electrofisiología, y microscopía, el efecto modulador de miconazol sobre los canales iónicos Kv10.1 y Nav1.7.

9.2. Objetivos específicos

1. Validar el ensayo de FLIPR® de potencial de membrana en las líneas celulares HEK-Kv10.1, HEK-Nav1.7 para la rápida identificación de moléculas pequeñas con acción sobre dichos canales.
2. Corroborar mediante ensayos de *patch-clamp* las moléculas identificadas en los ensayos de FLIPR con efecto sobre los canales iónicos dependientes de voltaje Kv10.1, Nav1.7.
3. Determinar si miconazol tiene efectos sobre propiedades biofísicas como el voltaje medio ($V_{1/2}$) de activación o inactivación de los canales iónicos a estudiar.
4. Realizar las gráficas dosis-efecto de miconazol sobre los canales Kv10.1, Nav1.7.
5. Evaluar el efecto de miconazol sobre las propiedades funcionales de las células transfectadas con los canales Kv10.1 y Nav1.7, como la viabilidad celular y la apoptosis.
6. Realizar simulaciones de acoplamiento molecular para evaluar el efecto de miconazol sobre el canal iónico Kv10.1.

10. Métodos

10.1. Cultivos Celulares

El procedimiento de cultivos celulares sigue lo descrito por Gutiérrez García (2022) y la metodología utilizada en el laboratorio. Se usaron las líneas celulares: HEK293 (*Human Embryonic Kidney*, por sus siglas en inglés) silvestres (*wild type*), las que se abreviarán como HEK-WT (CRL-1575, ATCC), la línea celular HEK293 que expresa de forma estable el canal iónico dependiente de voltaje de potasio $K_v10.1$ (HEK- $K_v10.1$) de humano (donadas gentilmente al LaNCA por el Dr. Walter Stühmer, del Instituto Max-Planck de Alemania), la línea celular que expresa de forma inducible el canal iónico de sodio $Na_v1.7$ (HEK- $Na_v1.7$) (60507 BPS Bioscience). Las células HEK-WT se mantuvieron en medio de cultivo DMEM (12800-017, Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (26140087, Gibco), 1% de penicilina/estreptomicina (15140122, Gibco). El medio de cultivo de las células HEK- $K_v10.1$ fue el mismo que el de las HEK-WT, al cual se le adiciona el antibiótico de selección zeocina (R25001, Invitrogen) (30 $\mu\text{g/ml}$). Las células HEK- $Na_v1.7$ son cultivadas en medio HEK-WT, con el antibiótico de selección zeocina (50 $\mu\text{g/ml}$) y blasticidina (50 $\mu\text{g/ml}$) (R210-01 Gibco); el medio de inducción utilizado es medio HEK-WT con butirato de sodio (10 $\mu\text{g/ml}$) (sc-202341B, Santa Cruz Biotechnology) y doxiciclina (10 $\mu\text{g/ml}$) (SC-337691, Santa Cruz Biotechnology). Las células se cultivaron a 37 °C y 5% de CO_2 en frascos T25 (Corning, 430639). Para pasar las células se utilizó tripsina (sc-391060, Santa Cruz Biotechnology) al 0.25 %.

10.2. Ensayos de FLIPR® de potencial de membrana

Los ensayos de FLIPR® de potencial de membrana (R8126, Molecular Devices) fueron realizados siguiendo las especificaciones del fabricante. Las células HEK-WT, HEK- $K_v10.1$ y HEK- $Na_v1.7$ son sembradas en frascos de cultivo T25 (Corning, 430639) hasta alcanzar 80% de confluencia, tiempo en el que son despegadas mediante métodos enzimáticos usando tripsina-EDTA (0.25%; 59428C) y mecánicos (usando una pipetas de cultivo) sembradas en placas de cultivo de 96 pozos a una concentración de $1 \times 10^5/100 \mu\text{L}$ en su medio de cultivo respectivo y mantenidas en una incubadora durante 24 h. Transcurrido el tiempo, a cada pozo se le adicionan 100 μL de la solución de FLIPR®, la cual contiene el fluoróforo y la “máscara”, y se mantienen en una incubadora durante 30 minutos. Los compuestos de interés fueron diluidos en la solución de FLIPR® y son pre-incubados con éste. Después de la incubación la placa con células es llevada

al lector multimodal de placas FlexStation 3 (Molecular Devices) donde se realizan las lecturas de fluorescencia. Para las lecturas, el fluoróforo presente en el kit de FLIPR® es excitado con una longitud de onda de 530 nm y la fluorescencia emitida es detectada a 565 nm. El protocolo de registro consiste en 20 segundos de registro basal, entre el segundo 20-22 el equipo adiciona solución con alto potasio [60 mM] con la intención de despolarizar el potencial de membrana y activar a los canales dependientes de voltaje, los cambios en la intensidad de fluorescencia posteriores al estímulo son registrados durante 100 segundos.

10.3. Registros electrofisiológicos

Para estos experimentos se sigue lo descrito por Gutierrez García (2022). Para el registro de corrientes macroscópicas se utilizó la técnica de *patch-clamp* en la modalidad de fijación de voltaje y la configuración de célula completa. Las células se siembran en cubreobjetos circulares de 18 mm previamente tratados con poli-L-lisina. Las células en los cristales se mantienen 3 horas a 37 °C y 5% de CO₂ antes de comenzar los experimentos. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (19-22 °C) y los cristales con células son colocados en una cámara de registro y perfundidas constantemente con solución extracelular estándar mediante un sistema de perfusión por gravedad (2.5 ml/min). Las corrientes se registraron con un amplificador Multiclamp 700B (Molecular Devices), a una frecuencia de muestreo de 10 kHz y un filtro pasabajas de 2 kHz. La resistencia en serie fue compensada al 40 %. Los datos se digitalizaron usando la interfaz analógico-digital Axon Digitada 1550 (Molecular Devices). El control de los estímulos y la adquisición de los datos se realizó con el programa pClamp 10 (Molecular Devices). En estos experimentos se usaron pipetas con una resistencia de 2-5 MΩ fabricadas con capilares de vidrio de borosilicato (Kwik-Fil, WPI, USA). Cada pipeta se llenó con solución intracelular. Las soluciones de registro usadas se muestran en la tabla 1:

Tabla 1. Concentraciones en mM de las soluciones utilizadas para los registros electrofisiológicos en células HEK-K_v10.1, HEK-Na_v1.7.

	KCl	NaCl	MgCl ₂	EGTA	HEPES	Glucosa	CaCl ₂	Osmolaridad	pH
K_v10.1									
Intracelular	140	-	1	10	10	-	-	300 mOsm	7.4
Extracelular	5.4	140	1.2	-	10	10	1.8	300 mOsm	7.2
Na_v1.7									
Intracelular	125	10	-	10	10	-	0.134	300 mOsm	7.4
Extracelular	5	140	1.2	-	10	10	1.8	300 mOsm	7.2

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

Warner Instruments). Para la construcción de las curvas dosis-respuesta, los valores normalizados de corriente se graficaron y se ajustó a una Ec. de Hill:

$$\text{Inhibición} = I_{\max}(c^n/IC_{50}^n+c^n)$$

en donde, $I_{\max}$ es la inhibición máxima, IC_{50} la concentración a la cual se inhibe el 50% de la corriente, c es la concentración de la molécula ensayada y n es el coeficiente de Hill.

Para los registros en células HEK-K_v10.1, los protocolos de estimulación fueron tres: 1) para la construcción de las gráficas de corriente contra voltaje (I-V), el potencial de membrana de las células se fijó a -70 mV, desde este voltaje las corrientes fueron activadas con pulsos despolarizantes de voltaje de -100 a +50 mV en pasos de 10 mV, los cuales tenían 250 ms de duración; 2) para estudiar el curso temporal del efecto de las moléculas de interés se utiliza un pulso fijo de +50 mV con 250 ms de duración, aplicado cada 5 segundos; y 3) un doble pulso: el pre-pulso tiene una duración de 1.5 segundos, éste va desde los -110 mV hasta los 50 mV en pasos de 20 mV, pasado el pre-pulso se fija el potencial a un pulso de prueba a +30 mV con duración de 500 ms para estudiar la inactivación dependiente de voltaje, como se muestra en la figura 9.

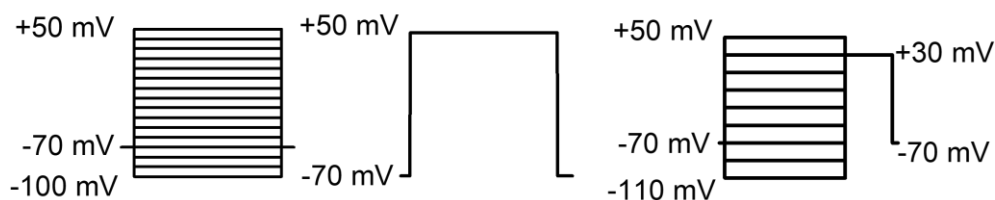


Figura 9. Protocolos utilizados para el registro de *patch-clamp* en la línea celular HEK-K_v10.1. Al extremo izquierdo, se muestra una serie de pulsos despolarizantes que van desde -100 mV hasta 50 mV, en pulsos de 10 mV, los cuales terminan fijando el potencial de membrana a -70 mV protocolo utilizado para construir los gráficos I-V. En medio, un pulso fijo de + 50 mV, con una duración de 250 ms. A la extrema derecha, un doble pulso: en el prepulso una serie de pulsos despolarizantes que van desde los - 110 mV hasta los + 50 mV, cada prepulso termina fijándose el potencial de membrana a + 30 mV (pulso de prueba), y regresa a - 70 mV.

Para los registros en células Nav1.7, los protocolos de estimulación fueron dos: 1) para construir las gráficas de corriente contra voltaje (I-V), el potencial de membrana de las células se fijó a -60 mV, desde este voltaje las corrientes fueron activadas con pre-pulsos despolarizantes de voltaje de -100 a +50 mV en deltas de 10 mV, los cuales tenían 100 ms de duración, y en el pulso de prueba a 0 mV tiene una duración de 50 ms, y 2) para estudiar el curso temporal del efecto de las moléculas de interés se utiliza un pulso fijo a 0 mV con 50 ms de duración, aplicado cada 10 segundos (ver figura 10).

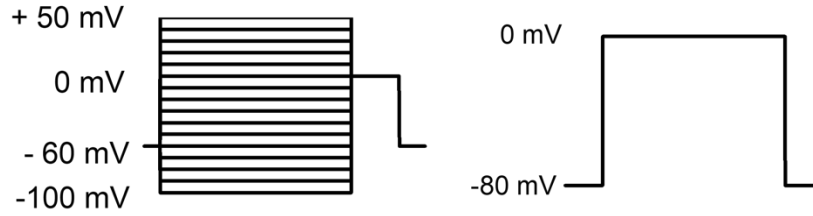


Figura 10. Protocolos utilizados para el registro de *patch-clamp* en la línea celular HEK-Nav1.7. En la figura de la izquierda, una serie de pulsos despolarizantes que van desde -100 mV hasta 50 mV, en pulsos de 10 mV, los cuales terminan fijando el potencial de membrana a 0 mV para regresar al potencial de membrana a -60 mV, protocolo utilizado para construir los gráficos I-V. A la derecha, un pulso fijo de 0 mV con una duración de 50 ms aplicado cada 10 segundos.

Para estudiar la biofísica del canal, se calcularon las conductancias de los canales Kv10.1 y Nav1.7 a partir de las siguientes ecuaciones:

$$G_K = \frac{I_K}{(V_M - V_K)}$$

$$G_{Na} = \frac{I_{Na}}{(V_M - V_{Na})}$$

Donde V_m es el potencial de membrana fijado, V_K y V_{Na} son los potenciales de equilibrio de potasio y sodio respectivamente, e I_K e I_{Na} son las corrientes iónicas medidas en cada pulso de voltaje de los gráficos IV.

10.4. Preparación compuestos

Todos los compuestos fueron almacenados a -20°C en stocks disueltos en DMSO y a una concentración de 50 o 100 mM (ver tabla 2, en la sección Anexos). Para los experimentos electrofisiológicos los compuestos se disolvieron a la concentración deseada en solución extracelular normal de registro.

10.5. Viabilidad Celular

La viabilidad celular se cuantificó a través de la medición simultánea de la fluorescencia emitida por las moléculas calceína green-AM ($\lambda_{exc} = 495/ \lambda_{em} = 515$ nm) (ENZ-52002, Enzo) o calceína blue-AM ($\lambda_{exc} = 322/ \lambda_{em} = 437$ nm) y yoduro de propidio ($\lambda_{exc} = 535/ \lambda_{em} = 617$ nm) (ENZ-52403, Enzo); la calceína tiene la propiedad de internalizarse en las células debido a que cuenta con un grupo funcional acetometil éster (AM) el cual le permite a travesar la membrana celular y una vez dentro de la célula las esterasas cortan los grupos AM, dejando disponible el fluoróforo para ser excitado y emitir fluorescencia.

Por otro lado, el yoduro de propidio se internaliza en las células únicamente cuando la membrana celular está comprometida, por lo que este marcador viaja al núcleo donde se acopla y emite fluorescencia. Las células HEK-WT, HEK-K_v10.1 y HEK-Na_v1.7 se sembraron a una concentración de 20X10³ células/100 µL de medio por pozo durante 24 horas. Transcurrida las 24 h, el medio de cada pozo fue sustituido por nuevo medio completo adicionado con cada una de las moléculas a ensayar y se incubaron durante una hora. Transcurrido dicho tiempo, el medio de cada pozo fue sustituido por DMEM y calceína green-AM (1 µM) y yoduro de propidio (1 µM), en el caso de las células HEK-Na_v1.7 se utilizó calceína azul-AM (0.5 µM); las células en estas condiciones fueron incubadas con los fluoróforos durante 15 min. Terminado el tiempo de incubación el medio es cambiado por PBS (solución amortiguadora de fosfato con pH 7.4, por sus siglas en inglés) debido a que el medio de crecimiento presenta autofluorescencia; después las placas de cultivo con las células fueron colocadas en el equipo ImageXpress Micro XLS (Molecular Devices), el cual es un microscopio invertido automatizado. Las células vivas fueron aquellas que mostraban señal fluorescente para calceína y las células muertas aquellas que mostraban señal para yoduro de propidio. Las imágenes fueron tomadas usando un objetivo de 20x. Para la cuantificación de células vivas y muertas se tomaron 9 imágenes por pozo. Como control positivo de células muertas se usó Tritón al 0.1%. El conteo total de células, para cada condición, representa 3 experimentos independientes realizados por duplicado. Las fotografías capturadas fueron analizadas por el procesador de imágenes FIJI (Schindelin *et al.*, 2012).

10.6. Ensayo de apoptosis

Los conjugados fluorescentes de anexina V se utilizan habitualmente para identificar células apoptóticas. El anticoagulante vascular humano anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de calcio (Ca²⁺) de 35 a 36 kDa que tiene una alta afinidad por el fosfolípido aniónico fosfatidilserina (PS). En las células sanas normales, la PS se encuentra en la superficie citoplasmática de la membrana plasmática. Sin embargo, durante la apoptosis, la membrana plasmática sufre cambios estructurales que incluyen la translocación de PS desde la cara interna a la externa (lado extracelular) de la membrana plasmática. La PS translocada en la membrana externa es una señal para que la célula sea reconocida y fagocitada por los macrófagos.

Para realizar este ensayo, las células HEK293-WT y HEK293-K_v10.1 se cultivaron en una placa de 96 pocillos con revestimiento transparente Costar durante una noche, alcanzando una confluencia del 60%. Pasado una noche, las células se expusieron durante una hora a las siguientes condiciones: control (sólo medio), DMSO (1:1000), y Miconazol (30 µM). Transcurrido el período de incubación, se retiró el medio que contenía el compuesto y se llevaron a cabo tres lavados con PBS frío. Se incubaron las células durante 15 minutos a temperatura ambiente con la solución de anexina (1 mL Buffer 1X

Anexina + 25 μ L Componente A (Anexina) + 5 μ L Componente B (Yoduro de Propidio). Pasado el tiempo de incubación se lavaron las células con PBS, y se llevaron al microscopio de epifluorescencia en el equipo ImageXpress Micro XLS (Molecular Devices) para ser leídas con un juego de filtros: Anexina ($\lambda_{exc} = 495 / \lambda_{em} = 515$ nm) y yoduro de propidio ($\lambda_{exc} = 535 / \lambda_{em} = 617$ nm).

Posterior al ensayo de anexina, para la cuantificación de núcleos se incubó cada pozo con 100 μ L de la solución Hoechst durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se removió el medio y se llevaron al microscopio de epifluorescencia en el equipo ImageXpress Micro XLS (Molecular Devices) para ser leídas con un juego de filtros: $\lambda_{exc} = 350 / \lambda_{em} = 461$ nm).

10.7. Ensayo tinción de colesterol libre (filipina)

Se cultivaron individualmente células HEK293-WT, HEK293-K ν 10.1 y HEK293-Na ν 1.7 en placas Costar Clear 96 pozos durante una noche con sus respectivos medios a una confluencia del 60 %. Pasada la noche, se incubaron durante una hora las siguientes condiciones: control (sólo medio), DMSO (1:1000), Miconazol (30 μ M). Pasado el tiempo de incubación, se retiró el medio con el compuesto y se realizaron tres lavados con PBS. Posteriormente se fijaron las células con paraformaldehído fresco al 3% durante una hora a temperatura ambiente. Una vez fijadas las células, se lavaron tres veces con PBS, y se incubaron con 100 μ L de 1.5 mg de glicina/ml de PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se tiñen las células con 100 μ L de solución de trabajo de filipina (0.05 mg/mL de filipina Sigma (F-9765) en PBS con 10% SFB) durante 2 horas a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de tinción, se realizaron 3 lavados con PBS, y se llevaron al microscopio de epifluorescencia en el equipo ImageXpress Micro XLS (Molecular Devices) para ser leídas con un juego de filtros: 340-380 nm.

10.8. Inmunotinción

Se trataron cubreobjetos con laminina (1 μ g/mL) durante 20 minutos para después sembrar sobre cada uno de ellos células HEK293-K ν 10.1 y HEK293-Na ν 1.7 respectivamente. Pasadas 24 horas, se seleccionan los cristales control (sólo medio de cultivo), los cristales control del vehículo (en este caso, DMSO en medio de cultivo 1:1000), y por último los cristales con tratamiento (miconazol a 30 μ M en medio de cultivo). Transcurrida una hora, se comienza el protocolo:

1. Se realizó un doble lavado con PBS a 4 °C.
2. Se adicionó la sonda lipofílica FMTM 4-64 FX durante 5 minutos.
3. Se realizó un doble lavado con PBS.
4. Se fijaron las células con paraformaldehído fresco al 3% durante 30 minutos, esto se realizó en hielo y agitación constante.
5. Se realizó un doble lavado con PBS.

6. Se permeabilizaron las células con tritón X-100 0.1 % durante 10 minutos en hielo y agitación constante.
 7. Se realizó un doble lavado con PBS.
 8. El bloqueo se realizó con BSA 5% durante 3 horas con agitación constante a temperatura ambiente.
 9. Se incubó el anticuerpo *KCNH1 human* acoplado a Alexa-Fluo 481 (1:200) durante toda la noche.
 10. Se realizó un doble lavado con PBS.
 11. Se montaron los cristales con FluoroShield con DAPI y con rojo nilo (1:2000).
- Por último, se dejaron secar los cristales a oscuras durante 24 horas.

10.9. Simulaciones de acoplamiento molecular

Para realizar las simulaciones con el canal K_v10.1 se descargó el cristal del canal de Mandala & MacKinnon, 2022 de la base de datos del PDB (8EOW) como receptor, así como el cristal del canal K_v11.1 (5VA1) de Wang & MacKinnon, 2017. También se descargó la molécula miconazol de la base de datos PubChem (4189) como ligando. Se utilizó el software gratuito AutoDock donde se prepararon el ligando y el receptor: para optimizar los recursos de cómputo se eliminó el agua de las moléculas lo cual facilita la unión del ligando con el receptor, se agregaron hidrógenos polares ya que éstos pueden generar interacciones entre el ligando y el receptor. Se utilizó el modelo de campo de fuerza AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement) donde se adicionaron las cargas de Kollman. El sitio de interés fue en el segmento S6 de los receptores, de la fenilalanina 656 (en el caso del canal K_v11.1) y fenilalanina 495 (K_v10.1). Para realizar las simulaciones se utilizaron los softwares libres AutoDock Vina y Discovery Studio, mientras que para la visualización de las moléculas se utilizaron los softwares libres PyMol y ChimeraX.

10.10 Análisis estadístico

Se utilizó el software OriginPro2019 (OriginLab, United States) y GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, United States). Todos los resultados se presentaron como el promedio con su error estándar asociado de al menos tres experimentos independientes. Para las pruebas t-test se tomó como parámetro estadísticamente significativo $p < 0.05$, mientras que para las pruebas de comparación múltiple como ANOVA de una vía y la prueba post hoc (Dunnet) se consideró como parámetro estadísticamente significativo $p < 0.05$.

11. Resultados

11.1. Ensayos de electrofisiología

Gracias a los resultados obtenidos por medio de los ensayos de fluorescencia (ver antecedentes) se realizaron ensayos de electrofisiología, ya que éstos miden directamente la corriente iónica producida tras la activación de los canales iónicos presentes en las membranas celulares; de esta manera, se pretende evaluar el efecto inhibitorio del miconazol. Se realizaron registros de *patch-clamp* en célula completa a diferentes concentraciones de miconazol, en las líneas celulares HEK-K_v10.1 y HEK-Na_v1.7. Para ello, primero se probó el vehículo (DMSO 1:1000) para corroborar que no tuviera actividad sobre los canales de interés.

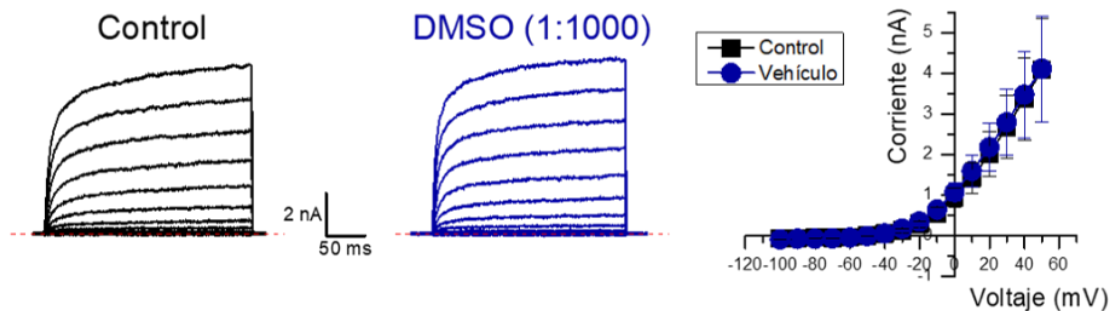


Figura 11. Registros de *patch clamp* de célula completa en HEK-K_v10.1. En el panel A) registros control de corrientes dependientes de voltaje adquiridos con el protocolo 1. En el panel B) corrientes dependientes de voltaje tras la perfusión de DMSO, el cual no presenta efecto alguno. En el panel C) gráfico IV del promedio de 3 células en situación control y tratadas con DMSO.

En la figura 11, en el panel A se muestran las corrientes K_v10.1 en la situación control utilizando un protocolo de pulsos despolarizantes (ver protocolo 1 en la sección de métodos) para estudiar la activación dependiente de voltaje, al igual que en el panel central, se grafican las corrientes que se registran una vez que se perfundió a la célula con DMSO (1:1000) durante 3 minutos. Como se puede observar el DMSO no afecta la amplitud de las corrientes K_v10.1, siendo de 4.10 ± 1.30 nA en control y de 4.08 ± 1.47 nA en presencia de DMSO, ambos medidos a +50 mV ($P = 0.97$, t-test pareado), por lo que nuestro vehículo es el ideal para poder probar miconazol a diferentes concentraciones. Mismo resultado se corrobora en el gráfico IV (figura 10). Ahora bien, se procedió a estudiar el efecto de miconazol sobre el canal K_v10.1.

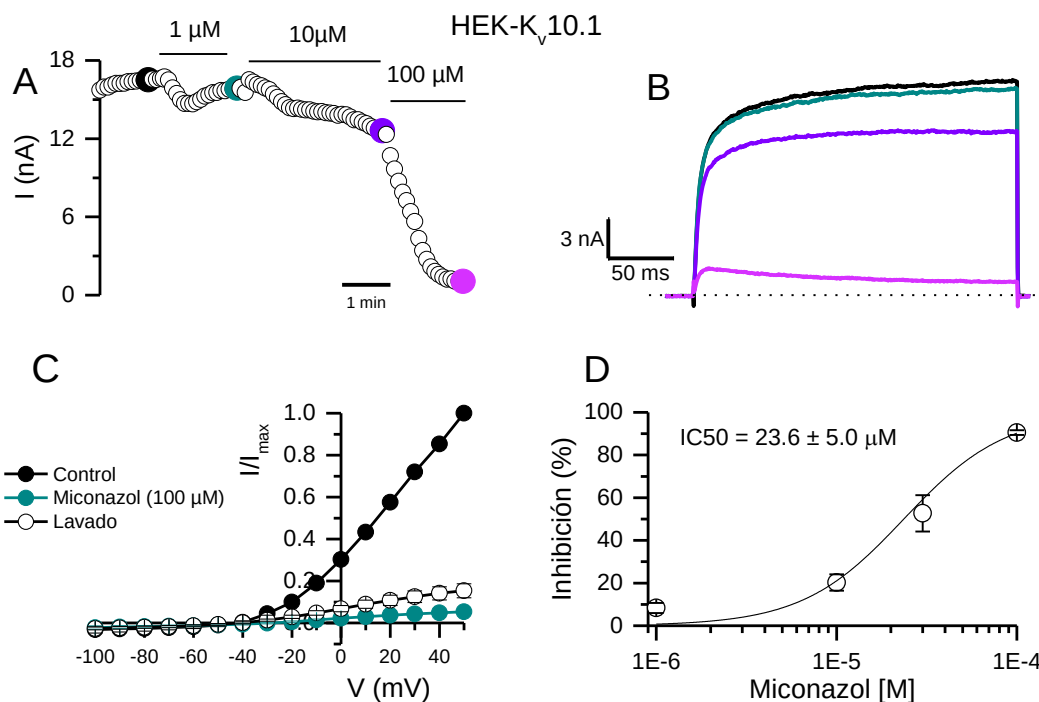


Figura 12. Ensayos de Patch-Clamp en HEK-K_v10.1. A) Curso temporal (rutina 2) en el que disminuye la corriente tras la aplicación de diferentes concentraciones de Miconazol. B) Corriente registrada en la rutina 2 tras la aplicación de diferentes concentraciones de Miconazol. C) Gráficos I-V en condiciones control, tratamiento y lavado, n=10. D) Gráfico dosis-respuesta, n=10.

En la figura 12A, se observa el curso temporal de diferentes concentraciones de miconazol sobre las corrientes K_v10.1 (medidas a + 50 mV); de esta manera, se puede observar que el miconazol tiene un efecto inhibitorio dosis-dependiente, con una inhibición del 93.0 % a 100 μM (n = 10, p < 0.01; t-test pareado). En la figura 12 B, se observan las corrientes K_v10.1 bajo cada una de las condiciones mostradas en la figura 12-A. En el panel C, se observan las gráficas corriente vs voltaje (IV) bajo 3 condiciones experimentales: la situación control (células con sólo medio), en presencia de miconazol (100 μM) y durante el lavado (10 minutos aproximadamente), no se observó una recuperación de la corriente. En la figura 12-D, se observa el efecto inhibitorio dosis-dependiente del miconazol sobre las corrientes K_v10.1, obteniendo una IC₅₀ = 23.6 ± 5.00 μM.

A partir del potencial de equilibrio teórico de potasio (V_K = -83.1 mV) y de la ecuación (I) y el ajuste de Boltzmann se calculó que el voltaje medio de activación del canal en la situación control fue de -11.8 ± 1.37 mV, mientras que en el tratamiento éste se desplazó hacia la derecha, alrededor de -0.55 ± 0.74 mV. En la figura 13 se observa la activación dependiente de voltaje del canal, la cual se desplaza hacia valores despolarizantes en las células tratadas con miconazol. Asimismo, con el ajuste de Boltzmann en ambas

condiciones se determinaron las pendientes de cada trazo, en el caso de las células control ésta tiene un valor de 14.9 ± 1.39 , mientras que las células tratadas con miconazol tienen una pendiente de 20.3 ± 0.81 .

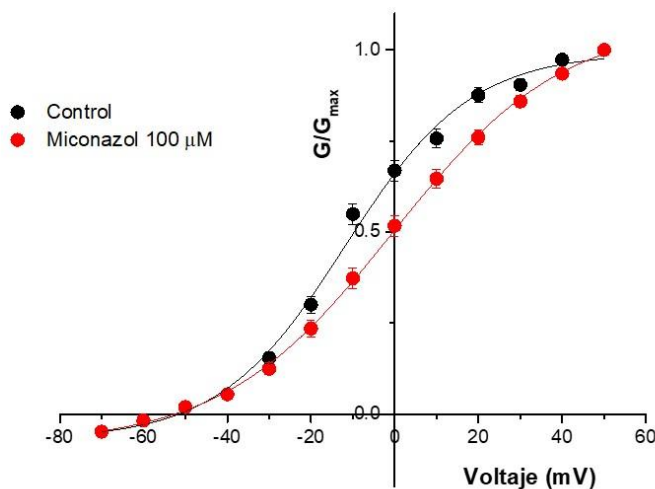


Figura 13. Ensayos de *Patch-Clamp* en HEK-K_v10.1. Conductancias normalizadas antes y después del tratamiento.

Para estudiar si miconazol modifica la inactivación dependiente de voltaje se utilizó el protocolo de doble pulso, el cual consiste en una vez activados los canales iónicos mediante pulsos despolarizantes, el potencial de membrana se fija a 0 mV, esta transición lleva a los canales iónicos activados al estado inactivado (ver sección de métodos). A las corrientes medidas a 0 mV, se les realizó el ajuste de Boltzmann para encontrar el voltaje medio de inactivación. De esta forma se determinó que el voltaje medio de inactivación de las células control es de 4.27 ± 9.38 mV, mientras que en las células tratadas con miconazol a 100 μ M, éste tiene un valor de -68.5 ± 1.56 mV. Como se puede observar en la figura 13 la aplicación de miconazol afecta la inactivación dependiente de voltaje del K_v10.1, desplazándola hacia la izquierda (valores hiperpolarizantes). Además, por medio del ajuste de Boltzmann, se encontró que la pendiente del trazo en las células control es de 16.4 ± 6.11 mientras que en las células tratadas con miconazol es de 14.9 ± 1.68 . Por lo que, la aplicación de miconazol no afecta a la sensibilidad de voltaje del canal K_v10.1 en la inactivación del mismo.

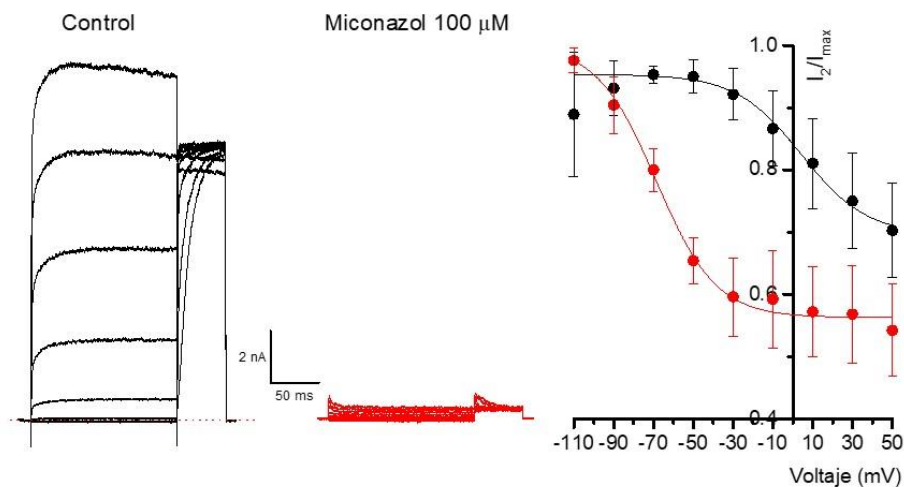


Figura 14. Ensayos de *patch-clamp* en HEK-Kv10.1. Inactivación dependiente de voltaje antes y después de la aplicación de miconazol.

Como la molécula miconazol desplaza el voltaje medio de activación e inactivación del canal Kv10.1 pero no afecta a la sensibilidad de voltaje en la activación de éste, entonces la molécula está actuando como un bloqueador del poro (Moreau et al., 2014), lo cual concuerda con lo descrito en el canal Kv11.1 descrito por Kikuchi et al., en el 2005.

Estos resultados muestran el efecto inhibitorio dosis-dependientes del miconazol sobre la línea celular HEK-Kv10.1. Aunado a este hecho, durante los registros electrofisiológicos pareciera que una vez que es perfundido el miconazol, las células se despegan del electrodo de registro por lo que se solía perder un sello estable, además de que cambiaba la morfología de algunas. Esto nos condujo a evaluar si miconazol tiene efectos citotóxicos sobre la línea celular HEK-Kv10.1, resultados que se describen más adelante en la sección de viabilidad celular.

Para entender el efecto de este compuesto sobre la línea celular HEK-Na_v1.7, se realizaron ensayos de electrofisiología similares a los ya expuestos. Se evaluó el vehículo DMSO (1:1000) para corroborar que no hubiera efecto sobre el canal Na_v1.7.

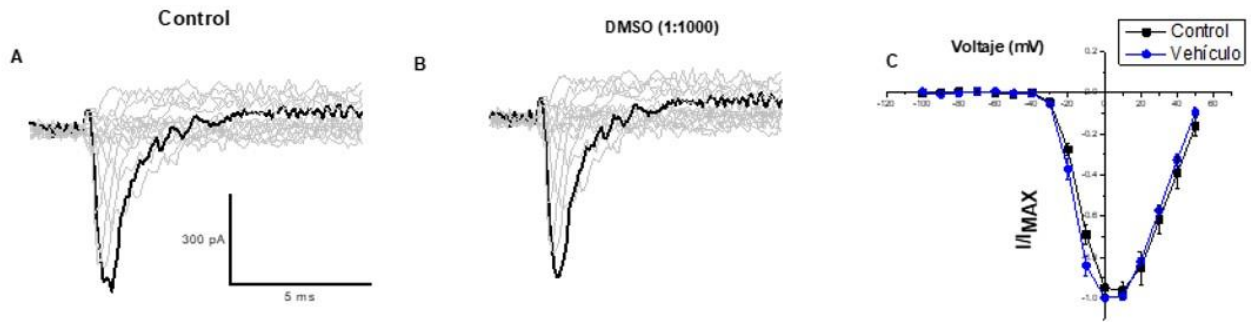


Figura 15. Registros de célula completa en HEK-Nav1.7. Para el registro de las corrientes dependientes de voltaje se utilizó la rutina 1 descrita en la metodología. A) Registro de las corrientes activadas por voltaje de las células HEK-Nav1.7 control, el trazo sólido representa la máxima amplitud de la corriente. B) Registro de las corrientes dependientes de voltaje de las células perfundidas con DMSO. C) Gráfico IV donde se comparan las corrientes del grupo control y el grupo DMSO, se observa que no hay diferencias significativas.

En la figura 15 panel A se observa un registro representativo de las corrientes dependientes de voltaje del canal en situación control, una vez adquirido este registro se perfundió DMSO (1:1000) durante 3 minutos, se procedió a hacer de nuevo el registro de las corrientes dependientes de voltaje y no hay diferencias (panel B). Esto mismo se observa en el panel C, donde tenemos el gráfico IV de las corrientes registradas (n=5) en situación control y vehículo.

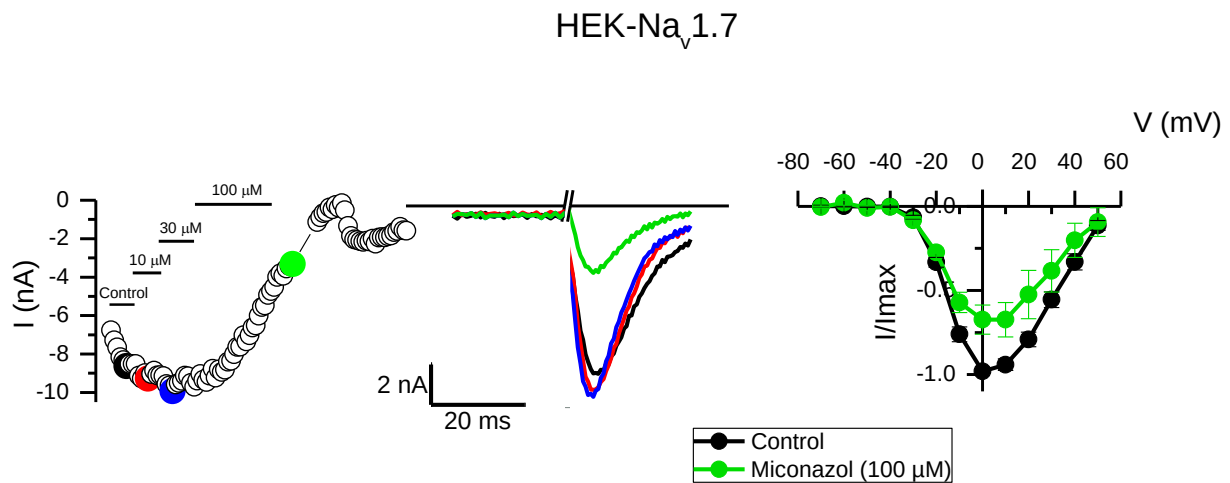


Figura 16. Ensayos de Patch-Clamp en HEK-Nav_{1.7}. A) Cuso temporal (rutina 2) en el que disminuye la corriente tras la aplicación de diferentes concentraciones de Miconazol. B) Corriente registrada en la rutina 2 tras la aplicación de diferentes concentraciones de Miconazol. C) Gráficos I-V en condiciones control y tratamiento (n=5).

Al igual que con el canal K_v10.1, miconazol produce un efecto inhibitorio, sólo que en este caso dicho efecto está dado únicamente a concentraciones altas sobre las corrientes del canal Nav_{1.7} activadas por un pulso despolarizante de voltaje de 0 mV (Fig. 16-A). Se observa que a una concentración de 100 μM, el miconazol produce una inhibición del $40.7 \pm 1.33 \%$ ($P = 0.01$; $n = 5$; t-test pareado). En comparación con el canal K_v10.1, el porcentaje de inhibición es menor. Además, el efecto inhibitorio es prácticamente irreversible. Cabe destacar que no fue posible calcular la IC₅₀ debido a que no se mostraron cambios significativos a concentraciones menores a 100 μM.

Para estudiar el efecto de la molécula sobre la biofísica del canal Nav_{1.7}, se realizaron ajustes similares a los ya descritos para el canal K_v10.1 a partir de los protocolos descritos en la sección de métodos.

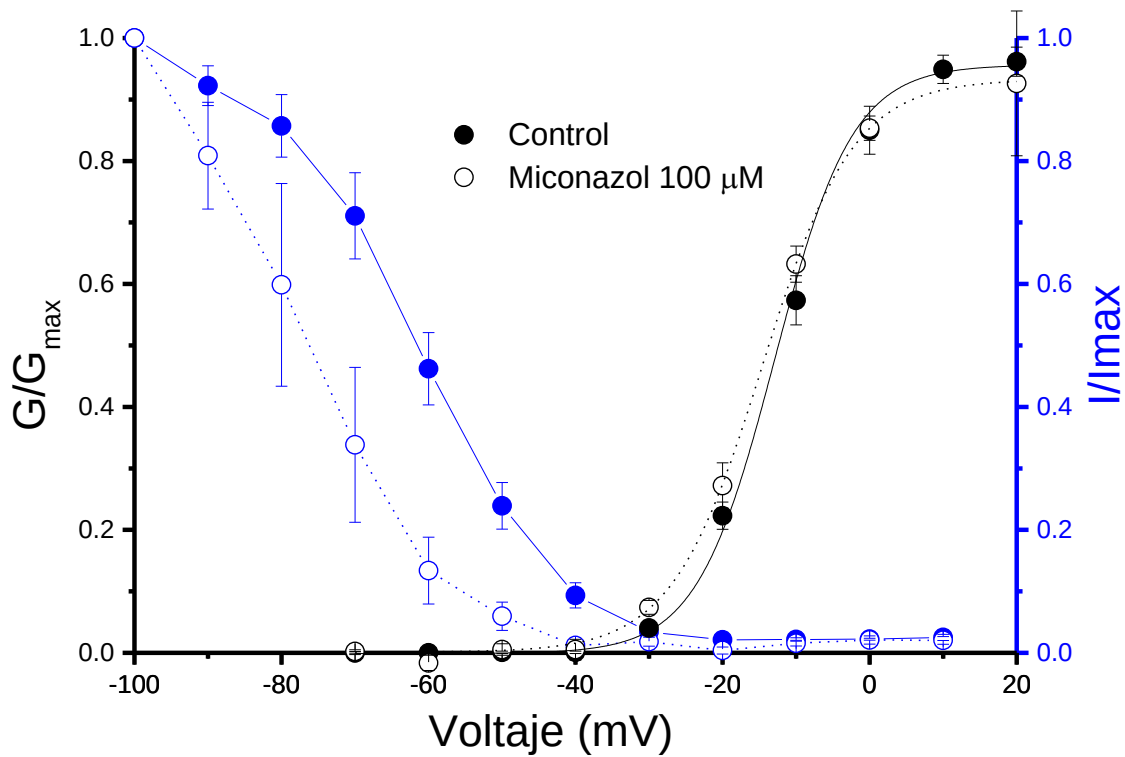


Figura 17. Ensayos de Patch-Clamp en HEK-Nav_v1.7. Conductancias normalizadas antes y después del tratamiento (rutina 1) en negro. Inactivación dependiente de voltaje antes y después del tratamiento (rutina 3) en azul.

Asimismo, a partir del potencial de equilibrio teórico de sodio ($V_{Na} = + 67.1$ mV) y de la ecuación (II), como el ajuste de Boltzmann, se obtuvo el voltaje medio de activación e inactivación. Se obtuvo que el voltaje medio de activación en células control es -12.3 ± 0.16 mV mientras que en células tratadas con miconazol 100 μ M éste tiene un valor de -14.0 ± 0.76 mV, por lo que no hay diferencias significativas. Al igual que la pendiente de dichos trazos es básicamente la misma: las células control tienen una pendiente de 6.21 ± 0.14 y las células tratadas con miconazol tienen una pendiente de 6.43 ± 0.66 . Por otro lado, la inactivación dependiente de voltaje sí se ve afecta en el tratamiento (figura 16), el voltaje medio de inactivación de las células control es de -61.78 ± 0.56 mV, mientras que las células tratadas éste es de -78.8 ± 0.91 mV, por lo que este parámetro en las células tratadas con miconazol se desplaza hacia la dirección hiperpolarizante. Sin embargo, la pendiente de ambos trazos (figura 17) es la misma, ya que en las células control ésta vale 9.36 ± 0.49 y en las células con miconazol 100 μ M ésta vale 9.73 ± 0.62 , por lo que miconazol no afecta a la sensibilidad dependiente de voltaje.

La molécula al afectar al voltaje medio de activación e inactivación, pero no a la sensibilidad de voltaje del canal $\text{Na}_v1.7$, podemos atribuir dicho efecto a un bloqueo directo del poro y no sobre alguna otra estructura del canal (Moreau et al., 2014). Además, estos resultados sugieren que el efecto de miconazol sobre los canales $\text{K}_v10.1$ y $\text{Na}_v1.7$ es a partir del bloqueo del poro de ambos canales, sin embargo, no de la misma manera ya que en el canal $\text{K}_v10.1$ existe una respuesta dosis-respuesta, mientras que en el $\text{Na}_v1.7$ no se puede corroborar dicho comportamiento.

Por último, cabe mencionar que, durante algunos registros de electrofisiología en ambas líneas celulares con la aplicación de miconazol, se observó que el sello de algunas de las células con el electrodo se perdía tras la aplicación del compuesto, o cambiaban de morfología, sobre todo en los registros con la línea celular $\text{Na}_v1.7$, por lo que se realizaron ensayos de viabilidad celular para evaluar el efecto citotóxico del compuesto.

11.2. Viabilidad Celular

Durante los registros de electrofisiología, algunas células al ser perfundidas con concentraciones altas de miconazol (50 y 100 μM) comenzaban a desprenderse del electrodo de registro, presentaban cambios en la morfología o bien, simplemente morían. Por ello, se realizaron ensayos de viabilidad celular que permitieran estudiar el porcentaje de células vivas/muertas a diferentes concentraciones de miconazol. Para estos ensayos se utilizaron las líneas celulares HEK-WT, HEK- $\text{K}_v10.1$, y HEK- $\text{Na}_v1.7$, incubadas durante una hora a concentraciones de 500 nM, 1 μM , 10 μM , 30 μM y 100 μM . Para el control de vivas sólo se incubaron con medio completo, y para el control de células muertas se utilizó tritón (1:1000). Además, para descartar efectos citotóxicos del vehículo DMSO se incubó durante una hora a la proporción más alta utilizada (1:1000). Para la cuantificación de células vivas y muertas se utilizó un doble marcaje fluorescente: Calceína verde (o azul en el caso de la línea celular HEK- $\text{Na}_v1.7$, ya que el canal está asociado a GFP) para células vivas y yoduro de propidio para células muertas. En las siguientes figuras se muestran imágenes representativas de cada condición tomadas con el microscopio de epifluorescencia ImageXpress, Molecular Devices.

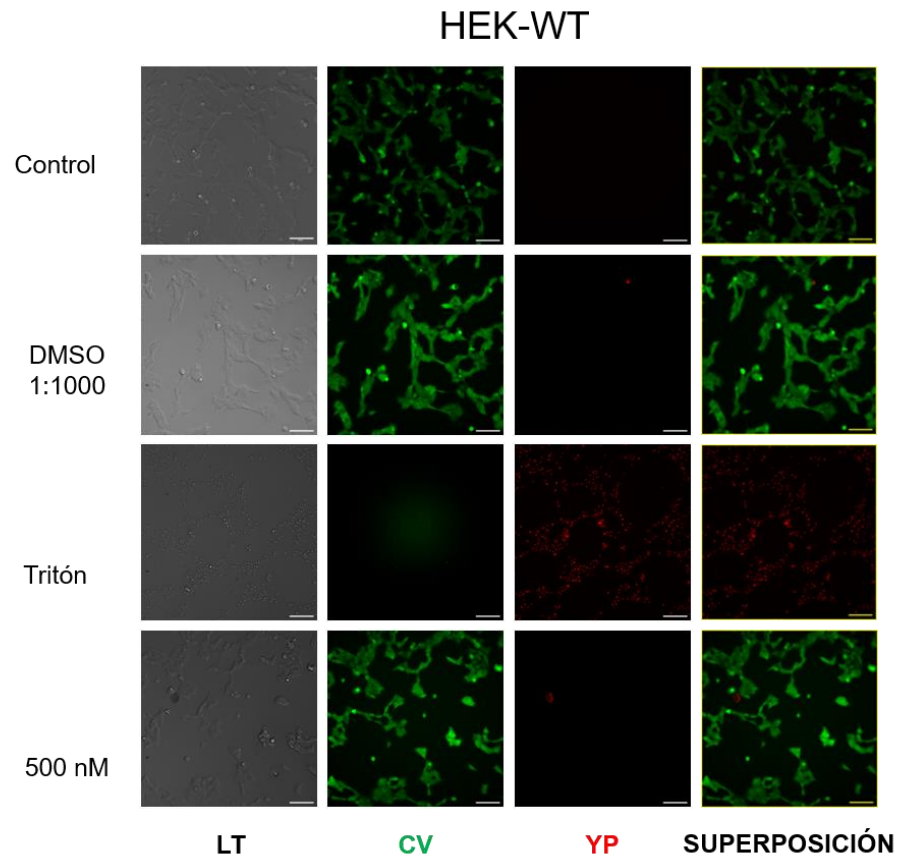


Figura 18. Ensayos de viabilidad celular en HEK-WT. En estas imágenes se muestra por columna los canales de luz transmitida, calceína verde (CV), yoduro de propidio (YP) y la unión de los canales CV y YP. Se evaluó el control de vivas, el vehículo, el control de muertas y miconazol a 500 nM.

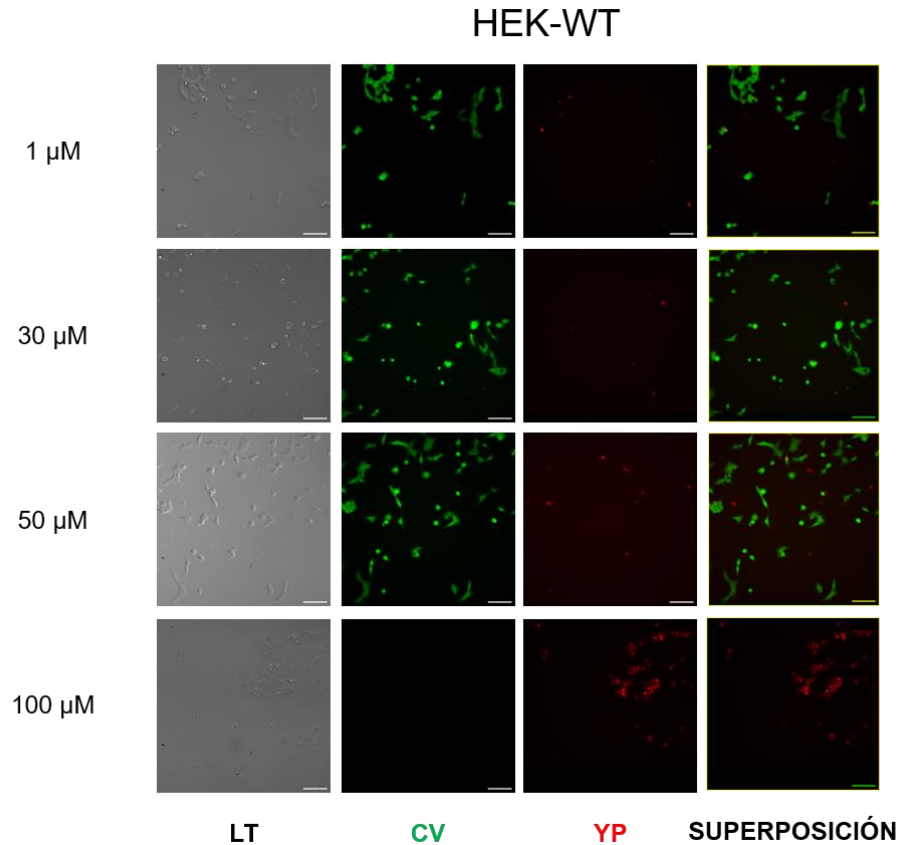


Figura 19. Ensayos de viabilidad celular en HEK-WT. En estas imágenes se muestra por columna los canales de luz transmitida, calceína verde (CV), yoduro de propidio (YP) y la unión de los canales CV y YP. Se evaluó miconazol a diferentes concentraciones.

La cuantificación de viabilidad celular en HEK-WT se realizó contando el número de células marcadas con calceína verde, y el número de células marcadas con yoduro de propidio, aquellas que estuvieran marcadas con ambos colores se contaron como células muertas. Para el análisis estadístico se realizó una ANOVA de una vía, tomando en cuenta el factor $p < 0.05$ para encontrar diferencias significativas, realizando una prueba *post hoc* de Dunnet.

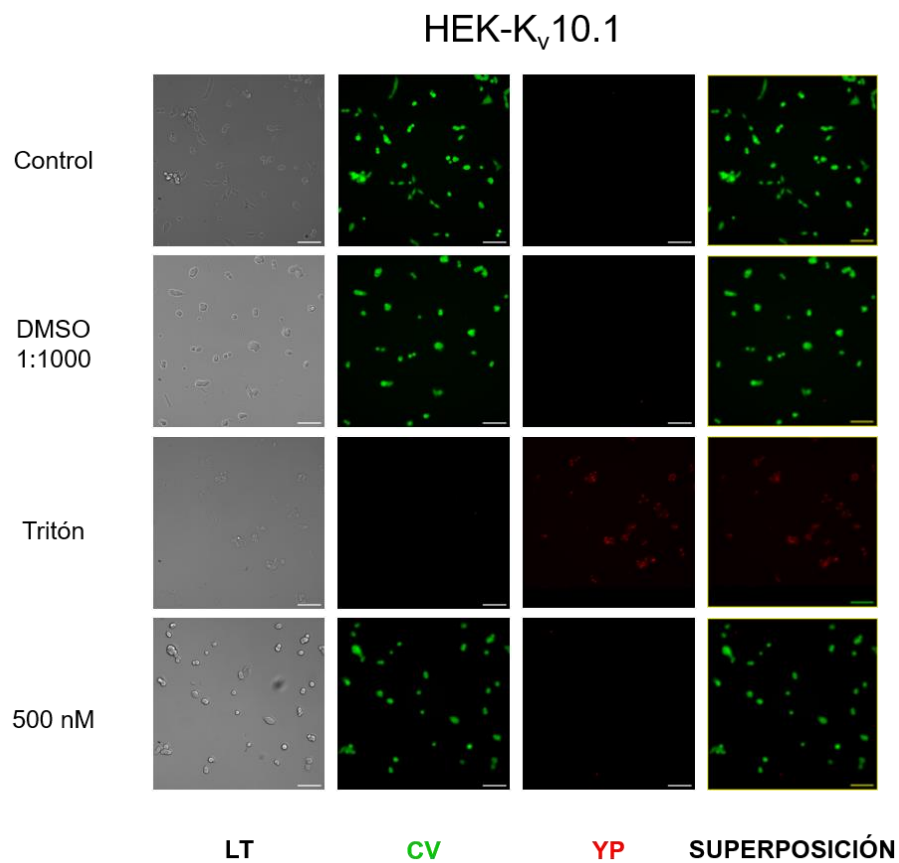


Figura 21. Ensayos de viabilidad celular en HEK-K_v10.1. En estas imágenes se muestra por columna los canales de luz transmitida, calceína verde (CV), yoduro de propidio (YP) y la unión de los canales CV y YP. Se evaluó el control de vivas, el vehículo, el control de muertas y miconazol a 500 nM.

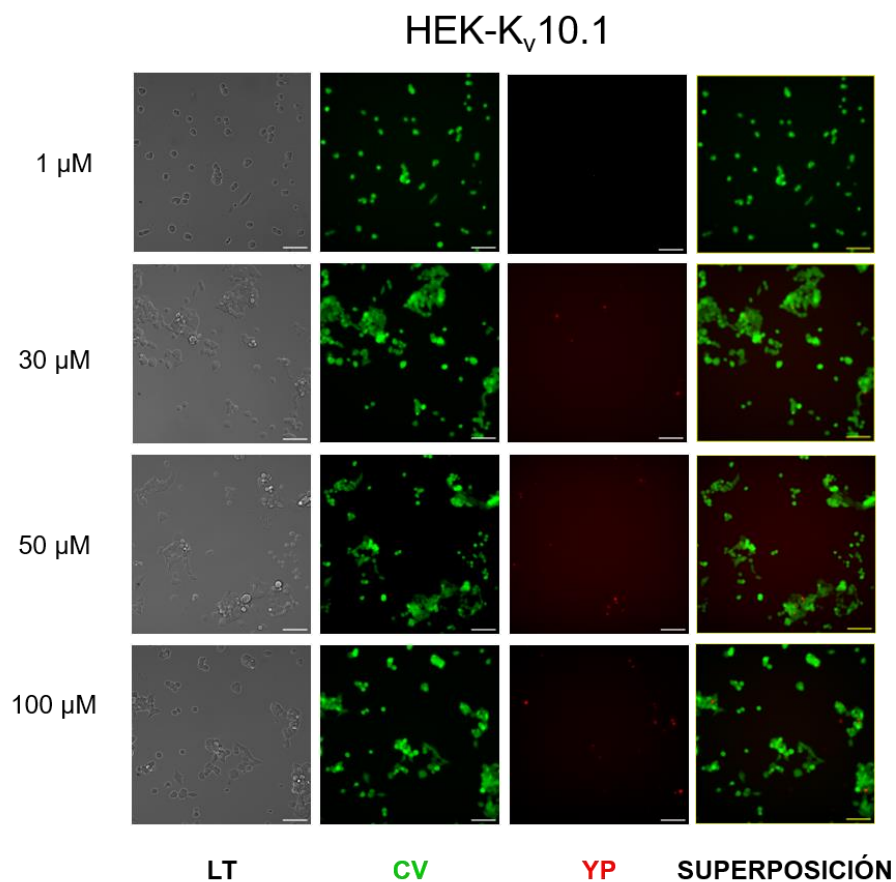


Figura 22. Ensayos de viabilidad celular en HEK-K_v10.1. En estas imágenes se muestra por columna los canales de luz transmitida, calceína verde (CV), yoduro de propidio (YP) y la unión de los canales CV y YP. Se evaluó miconazol a diferentes concentraciones.

Al igual que en las células HEK-WT, encontramos diferencias significativas en la línea celular HEK-K_v10.1 entre el grupo control y las células incubadas con miconazol. En este caso, a una concentración de 100 μ M se obtuvo un porcentaje de células muertas del 44.0 ± 0.86 % (cuantificación de células vivas y muertas, ver figura 22). El porcentaje de células muertas es menor en la línea celular HEK-K_v10.1 que en la línea celular HEK-WT, por lo que es posible que el canal otorgue mayor resistencia a las células, lo cual concuerda con lo que se ha observado en diferentes trabajos: el canal al ser sobreexpresado en tejido tumoral, éste otorga a las células mayor farmacoresistencia y radioresistencia (Luis et al., 2022). Modular farmacológicamente al canal se vuelve entonces un reto complicado, sin embargo, los resultados de electrofisiología y viabilidad sugieren que miconazol es un gran candidato para aplicaciones terapéuticas de éste en tejido tumoral.

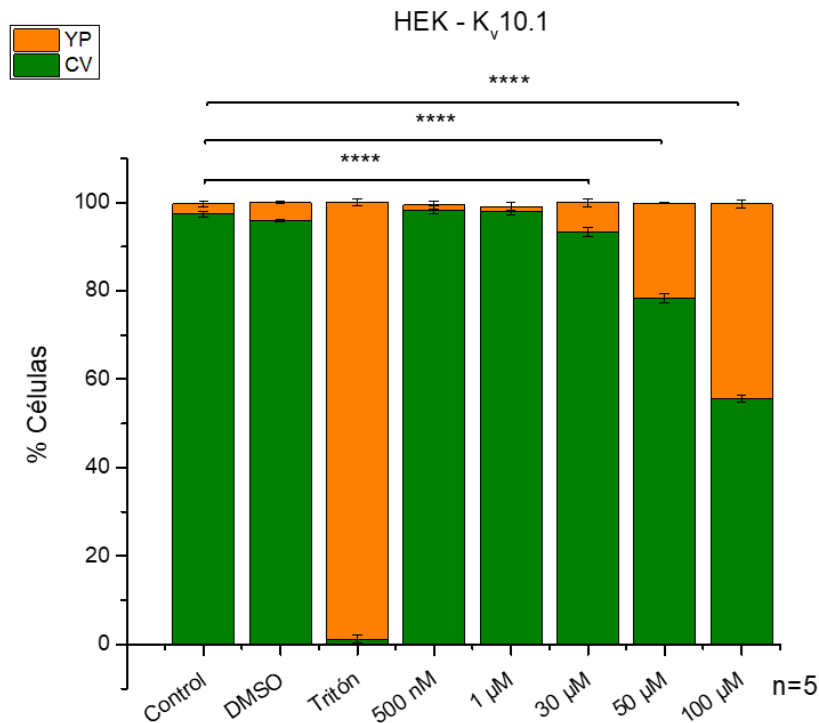


Figura 23. Porcentaje de células HEK-K_v10.1 vivas y muertas. Se muestra el promedio de 5 experimentos realizados por triplicado. Cada condición se compara con el grupo control.

Las imágenes anteriores muestran el efecto citotóxico de miconazol sobre las células HEK-K_v10.1, a comparación de las células silvestres, éstas presentan mayor número de células vivas, por lo que el canal pareciera conferir resistencia al antimicótico. Por otro lado, los ensayos de electrofisiología muestran que el canal Nav1.7 también se puede modular con la molécula miconazol, sin embargo, no mostró un efecto dosis-dependiente. Aun así, en los registros con HEK-Nav1.7 se observó que incluso a concentraciones bajas de miconazol, las células cambian de morfología o se despegan del electrodo de registro, por lo que se procedió a realizar ensayos de viabilidad en esta línea celular. Se utilizaron las mismas condiciones experimentales, con la modificación de que se utilizó calceína azul, debido a que el canal también tiene acoplado GFP, por lo que las señales de fluorescencia generarían interferencia entre ellas, dando resultados falsos o con errores.

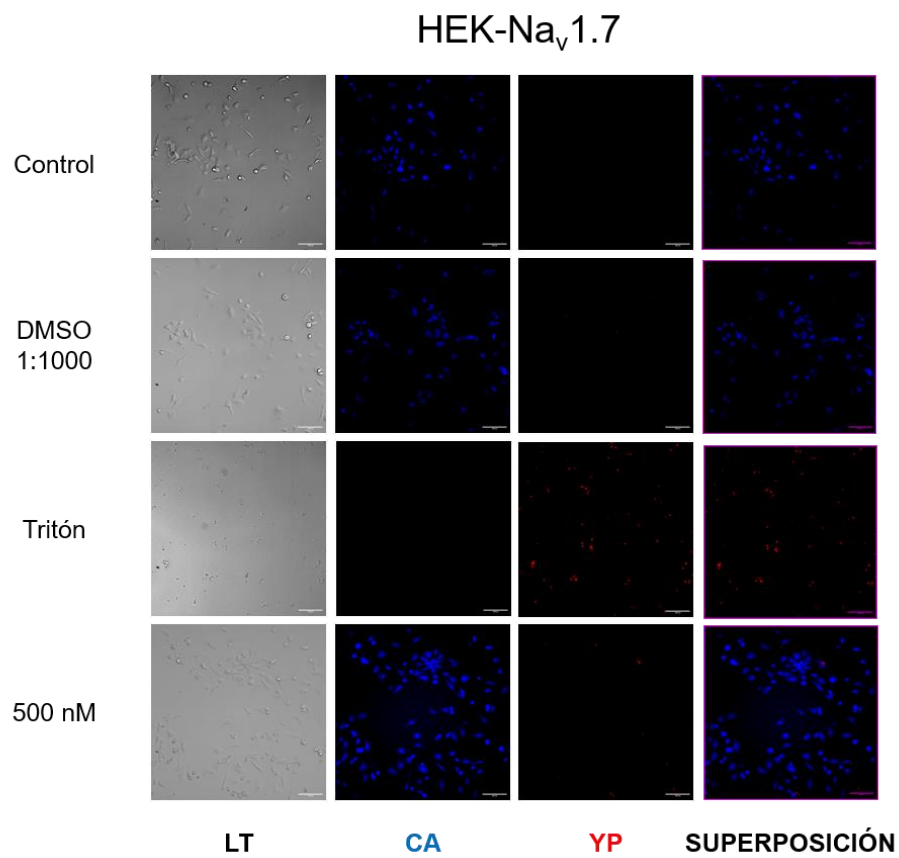


Figura 24. Ensayos de viabilidad celular en HEK- $\text{Na}_v1.7$. En estas imágenes se muestra por columna los canales de luz transmitida, calceína verde (CV), yoduro de propidio (YP) y la unión de los canales CV y YP. Se evaluó el control de vivas, el vehículo, el control de muertas y miconazol a 500 nM.

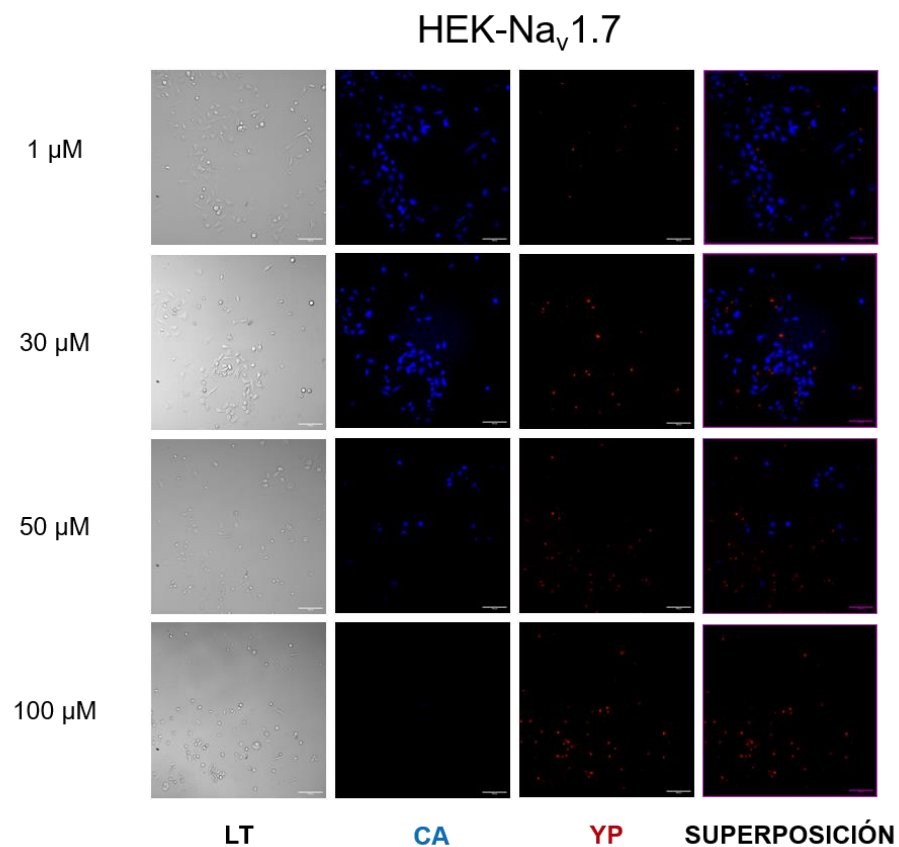


Figura 25. Ensayos de viabilidad celular en HEK- $\text{Na}_v1.7$. En estas imágenes se muestra por columna los canales de luz transmitida, calceína verde (CV), yoduro de propidio (YP) y la unión de los canales CV y YP. Se evaluó miconazol a diferentes concentraciones.

Las células HEK-Nav1.7 incubadas con miconazol presentan una menor viabilidad celular que las HEK-K_v10.1, y mayor que las células HEK-WT. A una concentración alta como 100 μ M aún presenta un efecto citotóxico del 67.0 ± 0.11 % de células muertas.

En la figura 26, se muestra el porcentaje total de células, el porcentaje de células marcadas como vivas y el porcentaje de células marcadas como muertas. Estos ensayos sugieren que el canal Nav1.7 otorga resistencia citotóxica a miconazol, puesto que hay un menor porcentaje de células muertas que a comparación de las células HEK-WT. Sin embargo, el número de células muertas en HEK-Nav1.7 comparado con HEK-K_v10.1 es mayor.

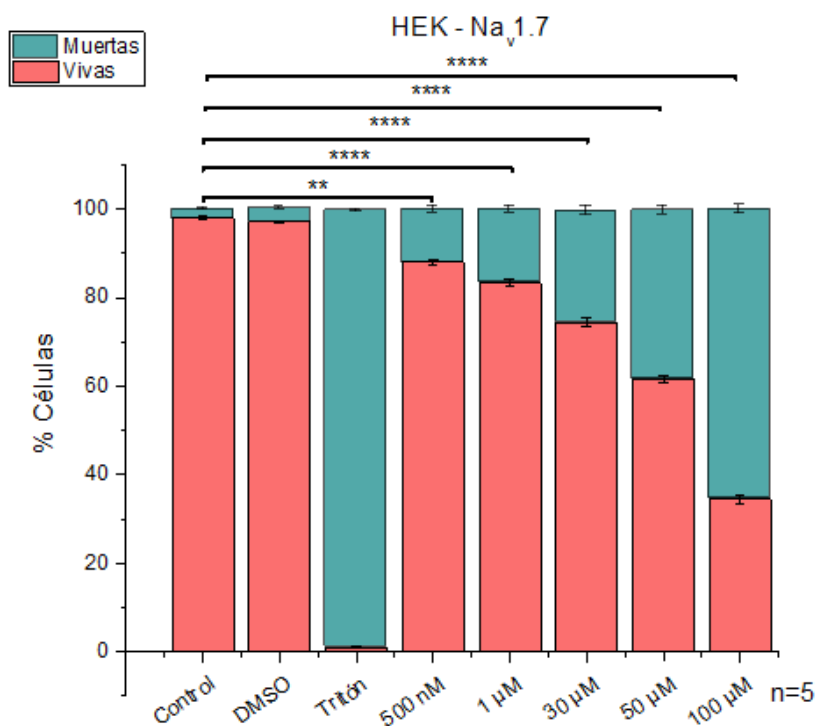


Figura 26. Porcentaje de células HEK-Nav1.7 vivas y muertas. Se muestra el promedio de 5 experimentos realizados por triplicado. Cada condición se compara con el grupo control.

Por lo tanto, el miconazol presenta efecto citotóxico en la línea celular HEK, dicho efecto disminuye en las líneas celulares HEK-K_v10.1 y HEK-Nav1.7. Ahora, nos preguntamos si las células que sobreviven tras el tratamiento con miconazol son totalmente viables, es decir, si miconazol es capaz de inducir apoptosis celular en el mismo tiempo de incubación que los ensayos de viabilidad celular.

11.3. Ensayo Apoptosis

Los resultados previos indican que el compuesto miconazol tiene un potente efecto citotóxico en las líneas celulares utilizadas, a excepción de la línea celular HEK-K_v10.1, la cual presentó menor número de células muertas. Por ello, y a partir de la IC₅₀ obtenida en los ensayos de electrofisiología, se decidió realizar ensayos de inducción de apoptosis a una concentración media (30 μ M). De esta manera es posible probar si las células HEK-K_v10.1 tratadas con el miconazol no mueren, o bien, si entraron (o no) a un estado apoptótico. Para cuantificar el número de células apoptóticas, se utilizó el kit de tinción de Annexina V acoplada a Alexa-Fluor 488, el cual tiene una alta afinidad por fosfatidilserina (un fosfolípido membranal intracelular). Está reportado que cuando las células entran en un estado de apoptosis, la fosfatidilserina se transloca hacia el lado extracelular de la membrana. Por lo que este fosfolípido queda expuesto y permite la unión de Annexina V.

Las siguientes imágenes (figura 26) son representativas del ensayo, el cual se realizó considerando 3 experimentos independientes realizados por triplicado. Para el análisis estadístico se utilizó una prueba ANOVA de una vía, considerando un factor $p < 0.05$ y una prueba *post hoc* de Dunnet.

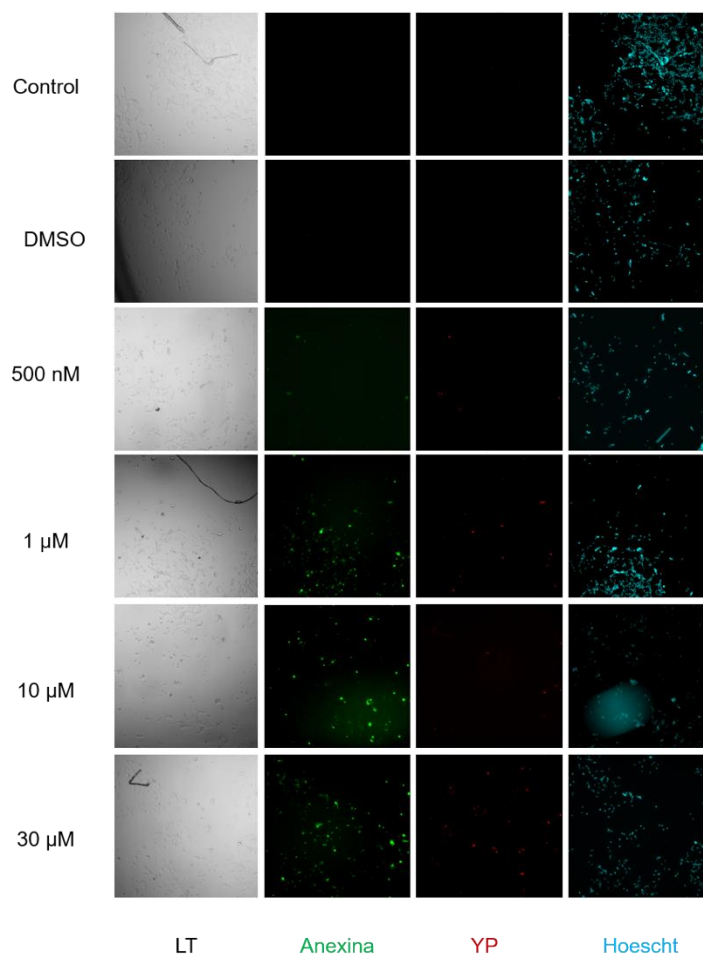


Figura 27. Ensayo de apoptosis en la línea celular HEK-WT tratadas con miconazol. Se muestran imágenes representativas del ensayo. La primera columna muestra el campo de luz transmitida (LT), la segunda columna muestra las células marcadas con anexina, la tercera columna las marcadas con yoduro de propidio (YP), la última columna aquellas que tienen el núcleo marcado con Hoechst.

La figura 27 muestra que el vehículo DMSO (1:1000) no induce apoptosis. De igual manera se observa que incluso a concentraciones bajas de Miconazol (1 μ M) es suficiente para inducir apoptosis en esta línea celular. Al realizar el análisis estadístico, obtuvimos que a 30 μ M hay un 88.0 ± 6.41 % de células apoptóticas, $P < 0.01$ (figura 27), lo cual representa un cambio significativo comparado con el control. En contraste, en esta línea celular los ensayos de viabilidad celular a una concentración de 30 μ M había un 80.4 ± 1.40 % de células vivas. Lo cual podría indicar que las células sobrevivientes al tratamiento con miconazol están en estado de apoptosis.

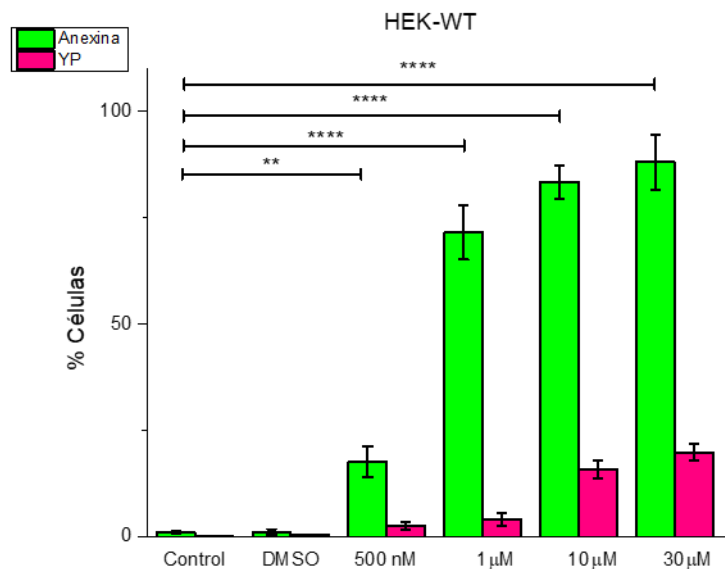


Figura 28. Porcentaje de células HEK-WT apoptóticas (anexina) y muertas (yoduro de propidio). Se muestra el promedio de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. Cada condición se compara con el grupo control.

Para la línea celular HEK-K_v10.1, se realizó el ensayo de apoptosis bajo las mismas condiciones experimentales que las HEK-WT. La figura 29 muestra imágenes representativas de dicho ensayo, realizado en 3 experimentos independientes por triplicado.

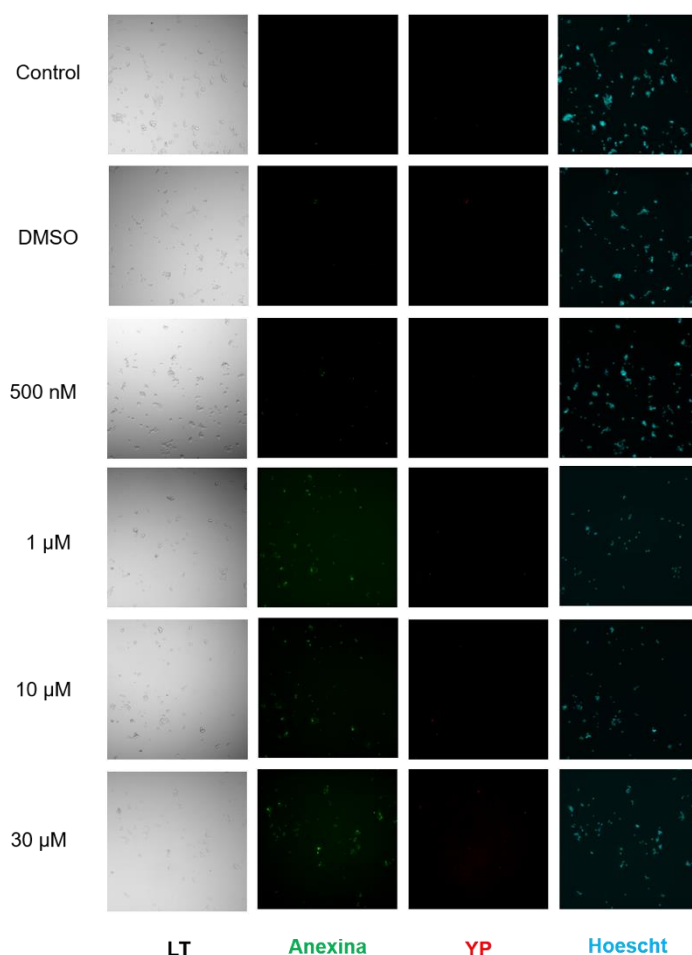


Figura 29. Ensayo de apoptosis en la línea celular HEK-Kv10.1 tratadas con miconazol. Se muestran imágenes representativas del ensayo. La primera columna muestra el campo de luz transmitida (LT), la segunda columna muestra las células marcadas con anexina, la tercera columna las marcadas con yoduro de propidio (YP), la última columna aquellas que tienen el núcleo marcado con Hoechst.

Para el análisis estadístico, se utilizó la prueba ANOVA de una vía, considerando un factor $p < 0.05$, y una prueba *post hoc*, de Dunnet. Se obtuvo que, a concentraciones bajas, como 1 μM , ya hay células teñidas con el indicador de apoptosis, lo cual muestra que las células HEK-Kv10.1 también son sensibles a la citotoxicidad del compuesto miconazol. Para contrastar, a una concentración de 30 μM se obtuvo en los ensayos de viabilidad celular que hay un 78.3 ± 0.99 % de células vivas, mientras que en los ensayos de apoptosis muestra que a 30 μM hay un 88.7 ± 5.71 % de células apoptóticas, (ver figura 30). Esto nos indica que las células sobrevivientes al tratamiento con miconazol entran en un estado de apoptosis, que eventualmente terminará con muerte celular (necrosis).

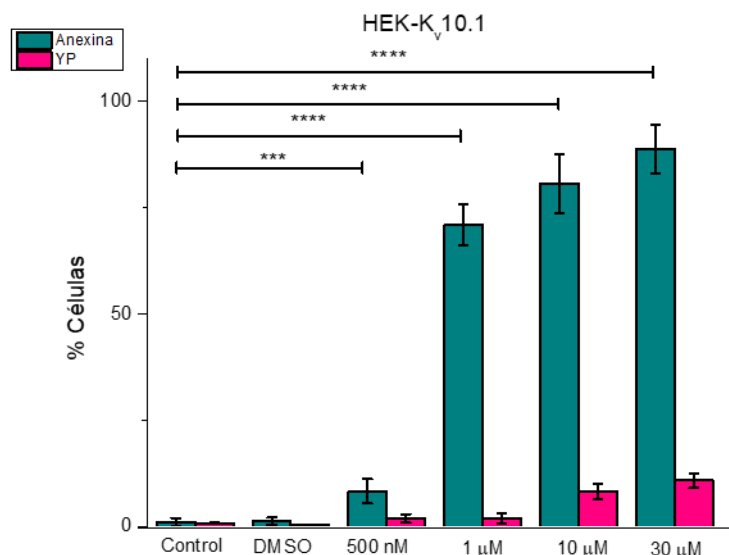


Figura 30. Porcentaje de células HEK-WT apoptóticas (anexina) y muertas (yoduro de propidio). Se muestra el promedio de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. Cada condición se compara con el grupo control.

El ensayo de apoptosis mediante el kit de Annexina indica que, en ambas líneas celulares, el miconazol es capaz de inducir apoptosis incluso a concentraciones bajas de 1 μ M. Sin embargo, en el conteo se observa que hay menor número de células apoptóticas en la línea celular HEK-K_v10.1 que en la silvestre.

11.4. Ensayo Filipina

Como se mencionó en la introducción, algunos canales iónicos pueden modularse por colesterol, como el canal iónico K_v10.1. Por otro lado, el mecanismo de acción de miconazol sobre las células de los hongos es a través de la inhibición de la síntesis de ergosterol de sus membranas celulares, componente esencial de su membrana celular, y que es un símil al colesterol en las células de mamíferos. Dicho lo anterior, se consideró evaluar si el miconazol es capaz de modular la actividad iónica del canal K_v10.1 como un posible efecto sobre un componente membranal como el colesterol. Para responder si miconazol actúa directamente en los canales K_v10.1 o Na_v1.7 se realizaron tinciones de colesterol membranal por el kit de tinción filipina, el cual es un marcador directo de colesterol. Estos experimentos se realizaron bajo las condiciones control, DMSO, y tratamiento (miconazol a 10 μ M y 30 μ M, concentraciones de interés dados los resultados de viabilidad y apoptosis celular). La figura 31 muestra imágenes representativas de 3 experimentos independientes por triplicado.

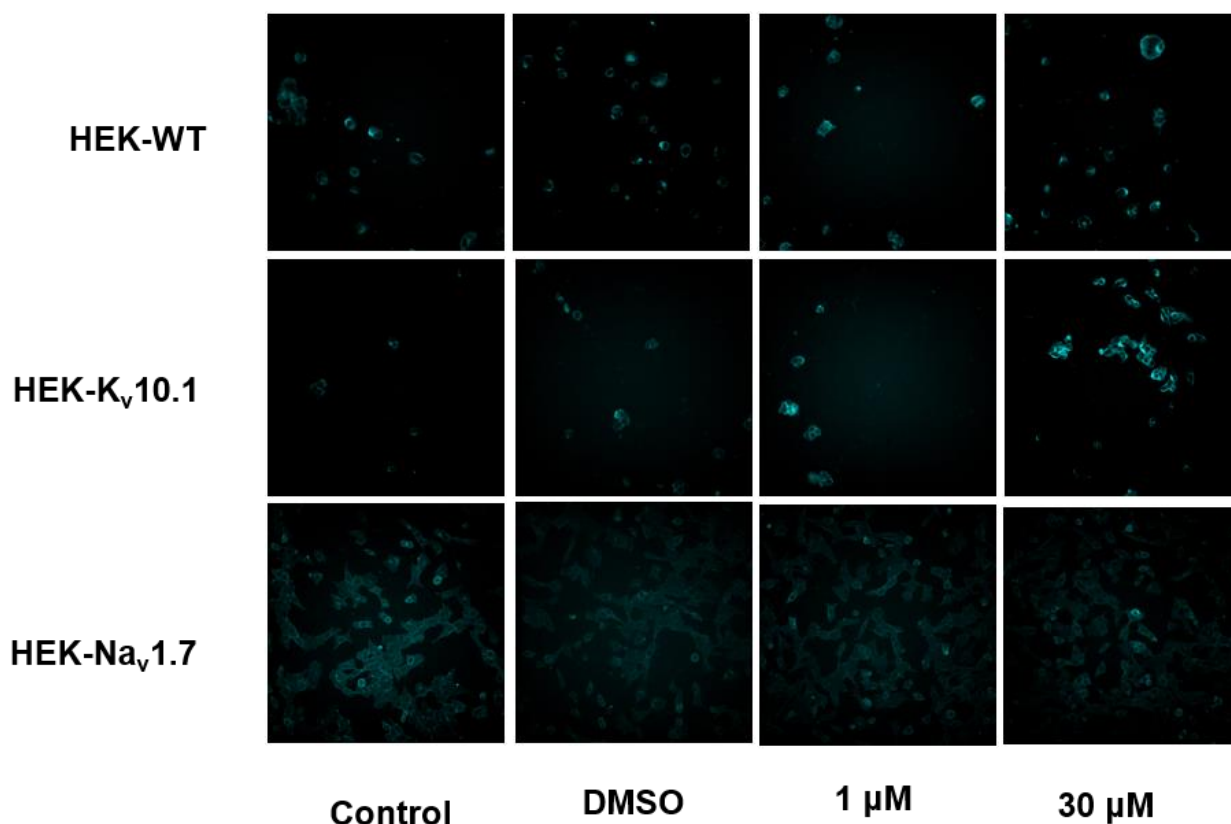


Figura 31. Marcaje de colesterol membranal en las líneas celulares HEK-WT, HEK-Kv10.1 y HEK-NaV1.7. Cada renglón muestra las diferentes líneas celulares, y cada columna es una diferente condición experimental.

Estos ensayos muestran que el vehículo DMSO (1:1000) a comparación del control no genera ningún cambio estructural en el colesterol membranal, esto es que permanece depositado en la periferia celular. Por otro lado, parece que el colesterol se encuentra marcado en la membrana y en el citosol. Lo cual sugiere que, tras el tratamiento con miconazol, el colesterol permanece intacto en la membrana, indicando que la molécula actúa directamente sobre el canal y no sobre el colesterol membranal. Sin embargo, por la resolución del microscopio de epifluorescencia y el tipo de marcaje, es posible que existan erros de cuantificación, como falsos positivos. Para comprobar esto, se realizaron ensayos de inmunoquímica que permitan localizar a los canales de interés, así como a los lípidos membranales.

Como se mencionó en la introducción, el colesterol tiene efecto modulador sobre los canales ya sea porque interactúa directamente con los motivos CRAC/CARC del canal, o bien, al abandonar la membrana plasmática, la célula sufre cambios estructurales que pueden alterar las propiedades de los canales. Indagando más sobre el efecto de

miconazol y los posibles cambios estructurales que genera, se procedió a realizar ensayos de inmunotinción, los cuales tienen mayor especificidad debido por una parte al uso de anticuerpos primarios, y, por otra parte, gracias a la alta resolución de la microscopía confocal.

11.5. Inmunotinción

Esta técnica permitió monitorear la posición del canal Kv10.1, por medio del acoplamiento del anticuerpo humano anti-KCNH1, en situación control, DMSO, y tratamiento con miconazol a 30 μ M. En el caso del canal Nav1.7, esto no fue necesario debido a que tiene *green fluorescent protein* (GFP) acoplado, por lo que no es necesario hacer un acoplamiento con anticuerpos. Además, se tiñeron las células con rojo nilo para el marcaje de lípidos membranales. Se utilizó DAPI para el marcaje de núcleos.

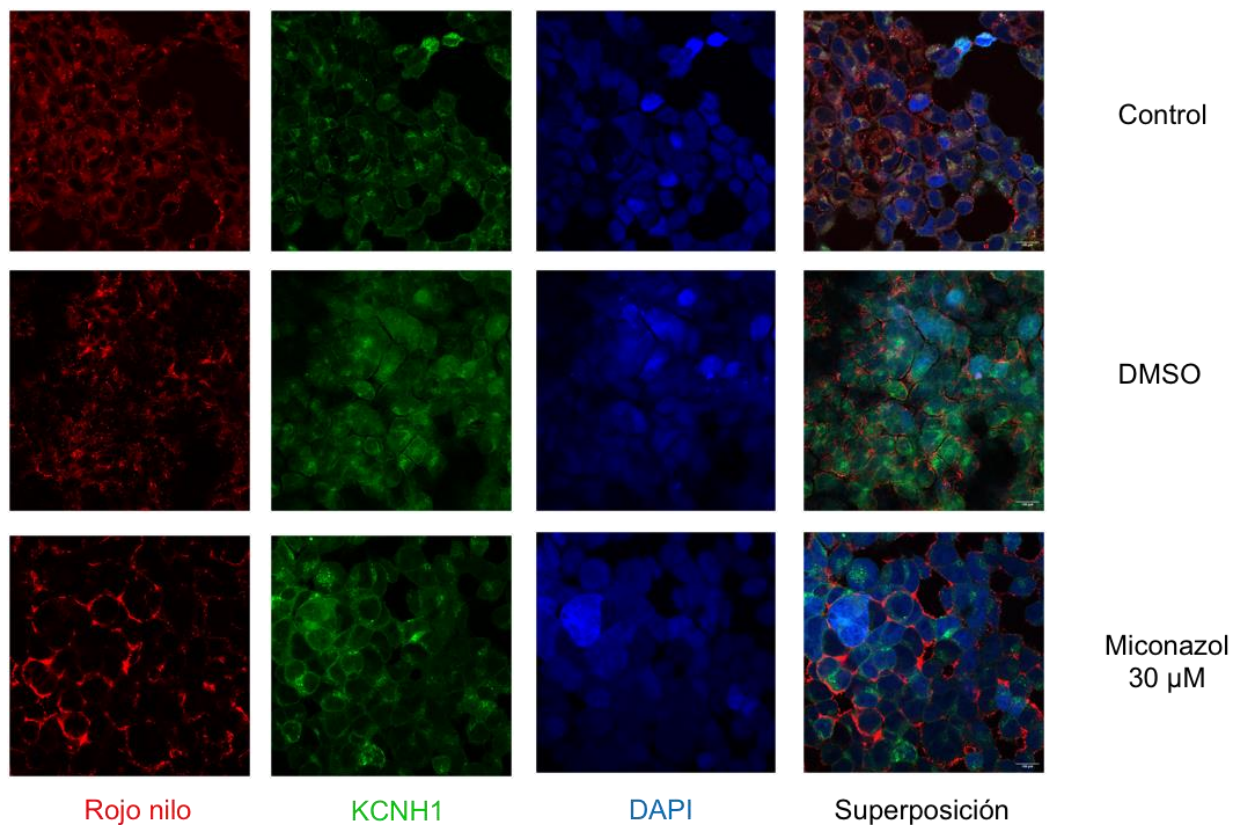


Figura 32. Inmunotinción en la línea celular HEK-Kv10.1. Cada renglón es una condición experimental diferente: Control, DMSO y miconazol. Por columna se muestra cada canal: Rojo nilo (marcador de lípidos), KCNH1 (marcador del canal Kv10.1), DAPI (marcador de núcleos), y Superposición (unión de los tres canales anteriores). Se muestran imágenes representativas de 3 experimentos independientes. Imágenes tomadas con un microscopio confocal, que permite obtener imágenes con profundidad.

En la situación control los lípidos se distribuyen en la periferia celular, al igual que el canal, mientras que los núcleos son grandes y ovalados. Esta situación se repite con las células incubadas con DMSO, podemos observar que tanto los lípidos como el canal se encuentran ampliamente distribuido en la membrana celular. Este mismo efecto se observa en las células incubadas con miconazol, vemos que no hay un desplazamiento de los lípidos, éstos permanecen intactos en la membrana. Hay zonas donde se ve internalización del canal, sin embargo, éste parece seguir acoplado a la membrana en la mayoría de las regiones. Esto es, quizá, la mejor evidencia de que el compuesto actúa directamente sobre el canal, y no sobre la membrana y su composición lipídica. Esto vuelve aún más sólido el posible uso de la molécula sobre tejido que sobreexpresa al canal, sin afectar a otros tejidos y su composición.

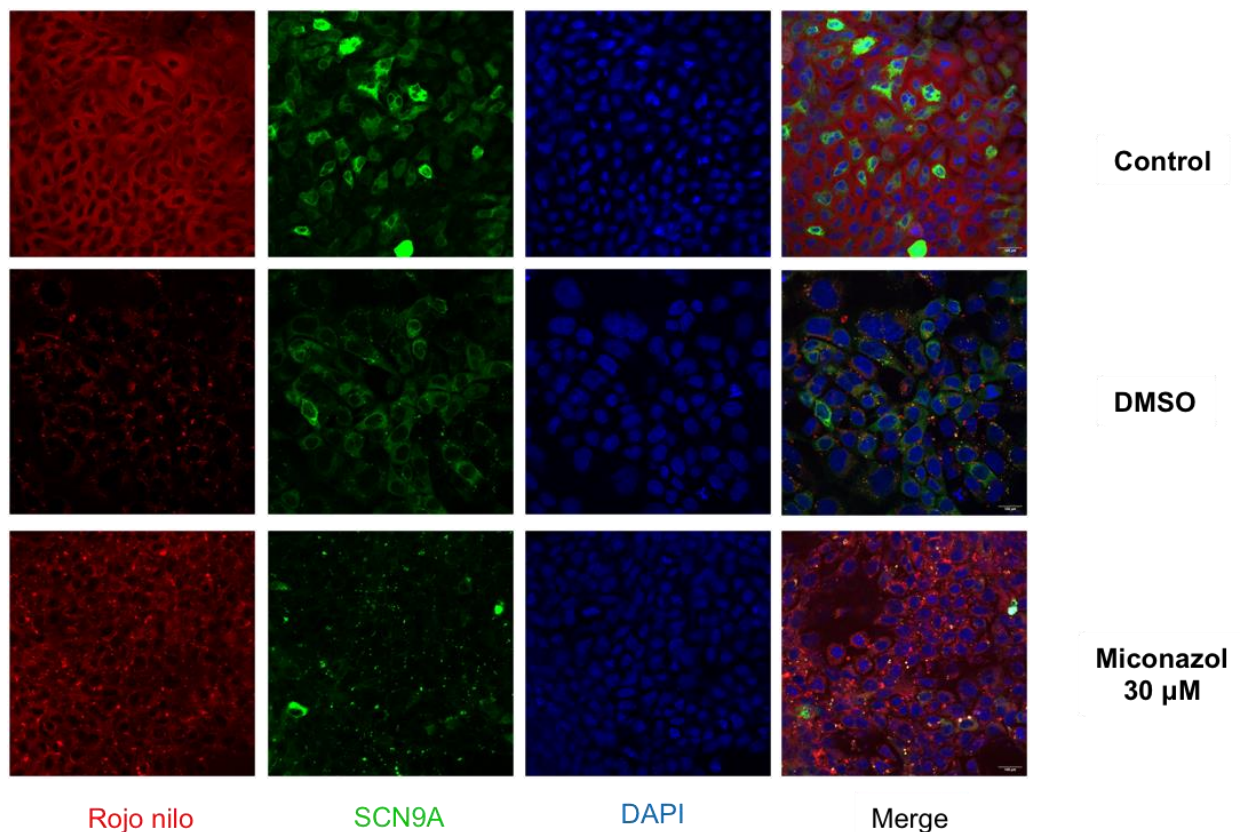


Figura 33. Inmunotinción en la línea celular HEK-Nav1.7. Cada renglón es una condición experimental diferente: Control, DMSO y miconazol. Por columna se muestra cada canal: Rojo nilo (marcador de lípidos), SCN9A (GFP acoplado al canal Nav1.7), DAPI (marcador de núcleos), y Superposición (unión de los tres canales anteriores). Se muestran imágenes representativas de 3 experimentos independientes. Imágenes tomadas con un microscopio confocal, que permite obtener imágenes con profundidad.

Por último, se muestra los ensayos de inmunoquímica realizados sobre la línea celular HEK-Nav1.7 (figura 33). Para estos ensayos no fue necesario la incubación de algún

anticuerpo primario debido a que el canal tiene acoplado a GFP, por lo que sólo se realizaron tinciones con DAPI y rojo nilo. En cuanto al control se observa la distribución de lípidos en la membrana celular, así como la distribución del canal, mismo que también se sabe es funcional gracias a registros de electrofisiología. En cuanto a las células incubadas con DMSO no hay un efecto que desplace o altere a la composición membranar, por lo que es un vehículo que funciona para estos ensayos. Y, por otro lado, en las células tratadas con miconazol se observa que los lípidos permanecen intactos en la membrana celular, sin embargo, el canal sí se ve internalizado en el citosol, por lo que esta molécula parece modular el ensamblaje del canal en la membrana. Esto podría explicar porque en los ensayos de electrofisiología no hay una respuesta dosis/dependiente, y por qué a concentraciones altas hay una inhibición de las corrientes activadas por voltaje.

11.6. Simulaciones de acoplamiento molecular

Como se ha descrito a lo largo de esta tesis, el trabajo sobre el canal $K_v11.1$ en el 2005 de Kikuchi y colaboradores mostró que la fenilalanina 656 del segmento S6 es importante para la interacción de moléculas pequeñas con dicho canal. Al realizar un alineamiento en la base de datos del UniProt se obtuvo que el canal $K_v11.1$ y $K_v10.1$ tienen un 39.33% de similitud, además de que ambos comparten en el segmento S6 el mismo residuo de fenilalanina, pero en diferentes posiciones, en el $K_v11.1$ se encuentra en la posición 656 mientras que en el $K_v10.1$ en la posición 495.

Además, nuestros resultados de electrofisiología muestran que el miconazol modifica de manera irreversible las propiedades biofísicas del canal $K_v10.1$, por lo que indican que se trata de un bloqueo de poro.

Por lo tanto, estos hechos en conjunto con los resultados de Kikuchi y colaboradores, conducen a la hipótesis de que el mecanismo de acción por el cual miconazol inhibe las corrientes iónicas en el canal $K_v10.1$ es por un bloqueo de poro, gracias a la interacción de la molécula con el segmento S6 en el residuo de fenilalanina 495. Para demostrar esta hipótesis se realizaron simulaciones de acoplamiento molecular como se describe en la sección de métodos.

Primero se evaluó el algoritmo computacional con la molécula miconazol y el canal $K_v11.1$, enfocándonos en el segmento S6 en el residuo de F656, para lo que se generó una matriz (*grid box*), de 60x60x60 de tal manera que cubriera dicho residuo de aminoácido.

Se evaluaron nueve posiciones probables (ver anexos, tabla 3), de las cuales se escogió aquella que tuviera la mayor afinidad (-7.90 kcal/mol). En este se obtuvo que miconazol tiene una interacción de tipo pi con el segmento S6 en el aminoácido fenilalanina 656 (figura 34). Esta interacción está dada por uno de los anillos bencénicos de la estructura

de miconazol y el segmento S6, lo cual es congruente con el trabajo de Kikuchi y colaboradores en el 2005.

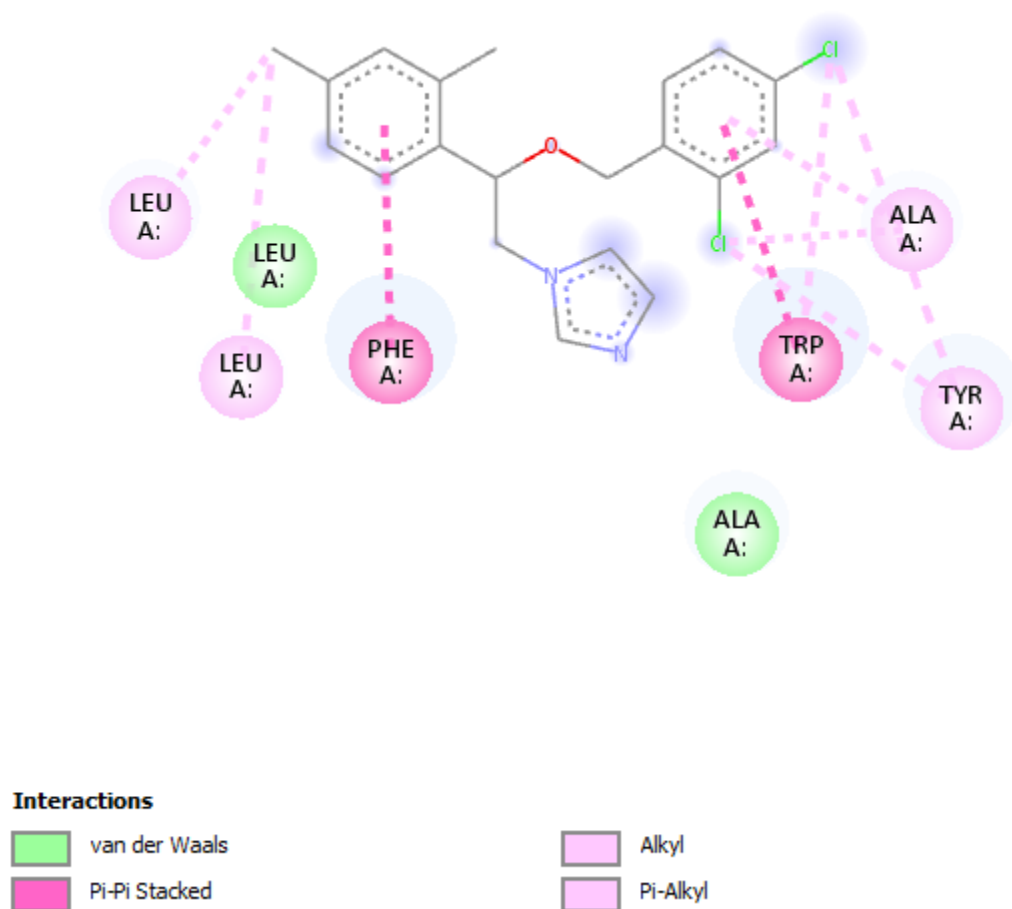


Figura 34. Mapa bidimensional de las interacciones posibles de miconazol con el canal K_v11.1. La interacción de miconazol con el canal K_v11.1 está dada por interacciones de tipo pi entre uno de los anillos bencénicos y el residuo de fenilalanina 656 del segmento S6. Como se observa en la figura, miconazol interactúa con el segmento S6, además de generar interacciones de van der Waals.



Figura 35. Simulación de acoplamiento molecular de miconazol con el canal Kv11.1. En la figura observamos la visualización obtenida en ChimeraX como resultado de la simulación de AutoDock Vina. En rojo se muestra una subunidad del canal. En medio de ésta se observa la molécula miconazol.

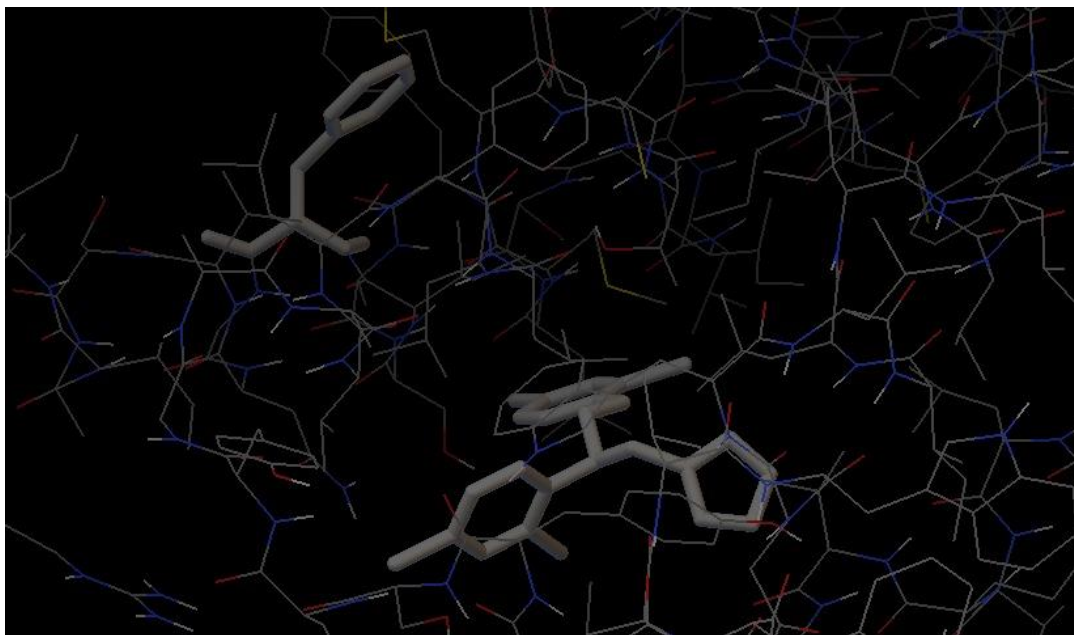


Figura 36. Simulación de acoplamiento molecular de miconazol con el residuo de fenilalanina 656 del canal Kv11.1. En la figura observamos la visualización obtenida en ChimeraX como resultado de la simulación de AutoDock Vina. En esta imagen está marcado el residuo de fenilalanina y de miconazol en las posiciones energéticamente más probables en el modelo de campo de fuerzas.

Se procedió a realizar el mismo algoritmo con el cristal del canal K_v10.1, teniendo como blanco al residuo de fenilalanina 495 del segmento S6 (figura 37). Se generaron nueve posiciones probables de la molécula miconazol de interacción con el canal iónico (ver anexos, tabla 4), y se escogió a la de mayor afinidad (-5.20 kcal/mol). Para este caso el algoritmo no encontró interacción posible entre el residuo de fenilalanina, el más probable energéticamente es la interacción con el aminoácido de leucina 448 del mismo segmento S6. Es posible que esta interacción sea la más probable, sin embargo, no descartamos el papel importante de fenilalanina 495, esto debido a las fenestraciones que genera en la membrana plasmática, como un mecanismo de introducción al poro de moléculas pequeñas como miconazol.

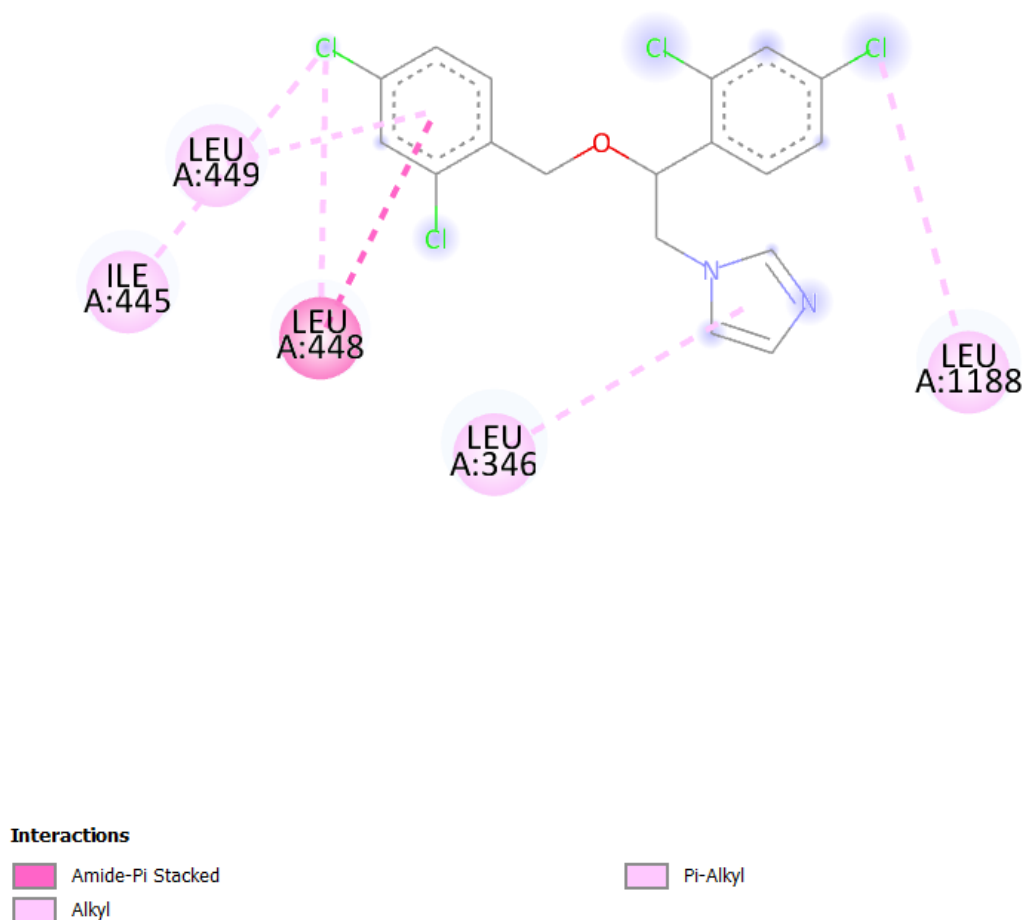


Figura 37. Mapa bidimensional de la interacción de miconazol con el canal K_v10.1. La interacción de miconazol con el canal K_v10.1 está dada por interacciones de tipo pi entre uno de los anillos bencénicos y el residuo de leucina 448 del segmento S6. Como se observa en la figura, miconazol interactúa con el segmento S6.

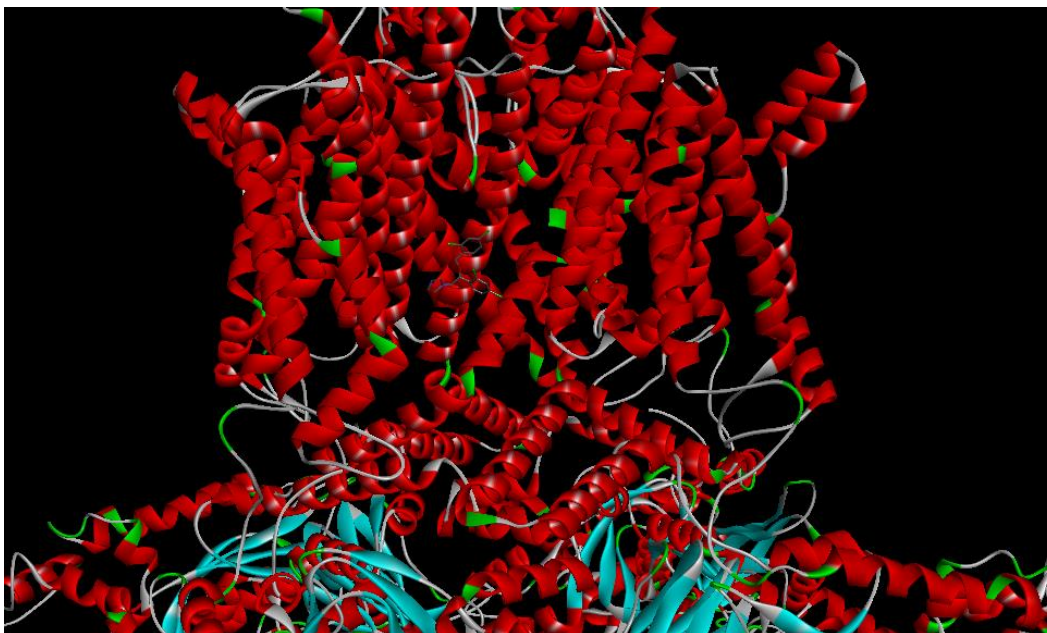


Figura 38. Simulación de acoplamiento molecular de miconazol con el canal Kv10.1. En la figura observamos la visualización obtenida en ChimeraX como resultado de la simulación de AutoDock Vina. En rojo se muestra el canal ensamblado con las cuatro subunidades de éste. En medio de ésta se observa la molécula miconazol.

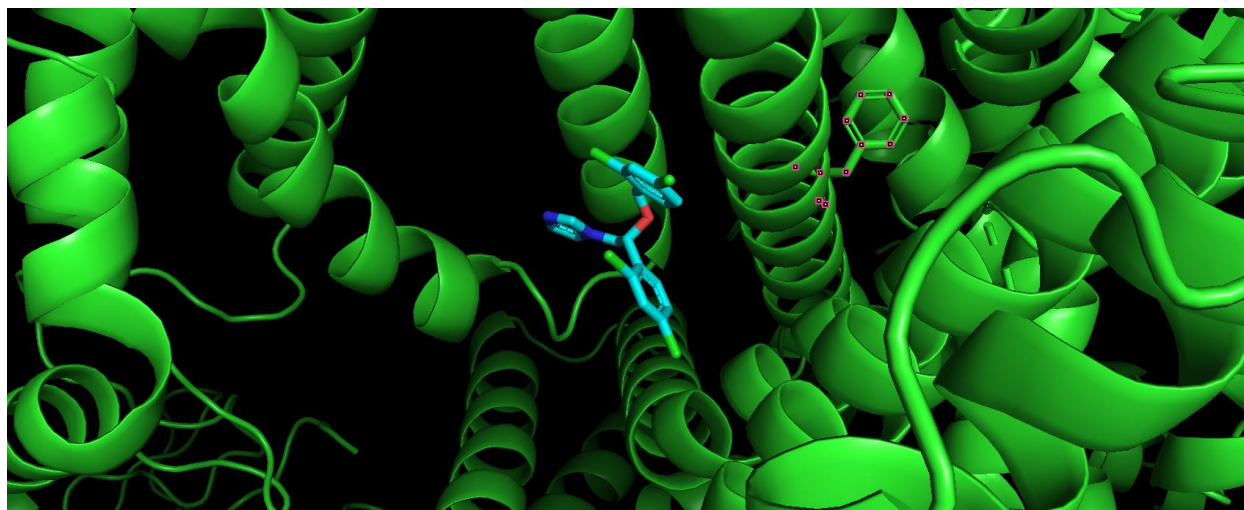


Figura 36. Simulación de acoplamiento molecular de miconazol con el residuo de fenilalanina 495 del canal Kv10.1. En la figura observamos la visualización obtenida en PyMol como resultado de la simulación de AutoDock Vina. En esta imagen está marcado el residuo de fenilalanina y de miconazol en las posiciones energéticamente más probables en el modelo de campo de fuerzas. Sin embargo, como se observa, el residuo aromático no está disponible para generar interacciones con la molécula miconazol.

12. Discusión

El kit de FLIPR de potencial de membrana es viable para la búsqueda de moduladores del canal iónico K_v10.1

En la búsqueda de moléculas pequeñas con potencial efecto sobre la actividad del canal iónico K_v10.1, por medio de ensayos de fluorescencia de alto desempeño, se identificaron moléculas prometedoras para la modulación del canal iónico como NS6180, RY796, sFTX, TTA y miconazol ($p < 0.01$), siendo este último de mayor interés debido a su potente disminución de la amplitud de la fluorescencia (79.2 %) a 100 μM . Por lo que presentó un efecto en la actividad del potencial de membrana de las células HEK-K_v10.1. Asimismo, al analizar la tasa de cambio de la fluorescencia, se observó que esta tasa en células HEK-K_v10.1 tratadas es más lenta que en el grupo control, y, por lo tanto, hay un cambio en la dinámica de la apertura de los canales estudiados, misma que se confirmó más adelante mediante los ensayos de *patch-clamp*.

Por otro lado, las células HEK-Na_v1.7 incubadas con la TTX (inhibidor clásico del canal), no presentaron cambios en la fluorescencia. Esto es debido a que el canal presenta una activación e inactivación rápida dependiente de voltaje, por lo que tras la adición del estímulo de alto potasio que despolariza el potencial de membrana no es posible ver el efecto ya que los canales se encuentran en el estado inactivado, lo cual se corroboró midiendo directamente el potencial de membrana en reposo de estas células mediante la técnica de *patch clamp*, el cual está alrededor de los -10 mV ($n=3$), por lo que los canales a este potencial básicamente están inactivados. El efecto de las células incubadas se adjudicó a su interacción directa con la membrana, ya que, como se observa en los ensayos de viabilidad celular, este compuesto compromete a la membrana celular de las líneas celulares utilizadas, aunque no se descarta que este efecto sea por la interacción de la molécula con otro ente molecular como los canales iónicos de potasio nativos de las células HEK.

En la bibliografía no hay publicaciones relacionadas con el efecto del miconazol en el potencial de membrana con técnicas de fluorescencia, por lo que hay que destacar que estos ensayos no se caracterizan para todas las líneas celulares. Sin embargo, para la búsqueda de nuevos moduladores del canal K_v10.1, el kit FLIPR es prometedor.

Miconazol es un bloqueador de poro de los canales iónicos K_v10.1 y Na_v1.7

Miconazol tiene un efecto inhibitorio dosis dependiente en el canal K_v10.1 con una $\text{IC}_{50} = 23.6 \pm 5.00\text{ }\mu\text{M}$, el cual además es irreversible. Aunado a esto, miconazol tiene la propiedad de modificar el voltaje medio de activación e inactivación del canal, modificando así su sensibilidad al voltaje. Estas características resaltan el hecho de que

miconazol es un bloqueador del poro, de acuerdo a lo descrito por Moreau et al. (2014), lo cual es lo esperado ya que es el mecanismo común por el cual las moléculas pequeñas suelen tener efectos inhibitorios sobre el canal. En cuanto a los ensayos de electrofisiología realizados en células HEK-Nav1.7, destaca una disminución en la corriente iónica registrada, sin embargo, no se observa un efecto dosis dependiente, dicho efecto sólo sucede a concentraciones altas (100 μ M). En células tratadas con miconazol el voltaje medio de activación del canal Nav1.7 permanece intacto; la inactivación dependiente de voltaje se desplaza hacia la dirección hiperpolarizante y aumenta la sensibilidad a voltaje, lo que significa que, comparado con miconazol, las tratadas con miconazol se inactivan a voltajes más negativos.

Por otro lado, ambos canales ensamblados funcionalmente en la superficie membranal celular generan fenestraciones, las cuales básicamente son “huecos” entre el canal y la membrana, por los cuales las moléculas pequeñas tienen la capacidad de entrar directamente en el poro y bloquearlo. En el caso del canal iónico Kv10.1 no ha sido tan explorado este campo, sin embargo, en el caso del canal iónico Kv11.1 han sido identificados distintos aminoácidos que juegan un papel importante en la teoría de las fenestraciones, como es el caso de la fenilalanina 656 (F656) del segmento S6 (parte del dominio formador de poro), misma que se repite en el Kv10.1 en la posición 515 del segmento S6. Lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Kikuchi y colaboradores en el 2005. En el caso del canal iónico Nav1.7, han sido más estudiadas las fenestraciones y su fisiopatología, conocidas como “fenestropatías”. En este canal se han identificado una serie de aminoácidos clave para la formación de estas fenestraciones en el segmento S6, como Ile386, Phe387 y Phe391, las cuales permiten que moléculas pequeñas como la vixotrigina, se incorporen en el poro y lo bloquen selectivamente.

Las fenestraciones generadas podrían explicar el mecanismo de acción por el cual miconazol, una molécula pequeña, inhibe las corrientes iónicas de los canales a partir del bloqueo del poro. Sin embargo, aún no es del todo entendido la diferencia entre la respuesta inhibitoria del canal Kv10.1 y el canal Nav1.7.

Por último, durante las rutinas de electrofisiología en Nav1.7, se observó un cambio en la basal del potencial de membrana, lo cual puede indicar que se está comprometiendo la membrana. Para determinar si el compuesto es citotóxico se realizaron ensayos de viabilidad celular, y se utilizaron concentraciones de interés a partir de la IC₅₀ del canal Kv10.1, estos están descritos en el siguiente punto.

Miconazol tiene un potente efecto citotóxico en la línea celular HEK-WT. En cambio, en la línea celular HEK-K_v10.1 este efecto disminuye.

En estos ensayos se determinó que hay un mayor efecto citotóxico en células HEK-WT que en células HEK-K_v10.1, por lo que el canal les confiere a estas células resistencia a miconazol, lo cual concuerda con sus propiedades carcinogénicas (ya que anteriormente se ha descrito el canal confiere farmacoresistencia y radioresistencia a las células en el cual se expresa).

Pese a que el canal K_v10.1 otorga una mayor resistencia citotóxica ante la exposición prologada de las células HEK a miconazol, aun así, hay un número considerable de células muertas a partir de 30 μ M, que es el valor cercano a la IC₅₀ del canal. La siguiente parte consiste en confirmar si efectivamente el canal otorga mayor resistencia a la muerte celular, por lo que realizaron ensayos de apoptosis a diferentes tiempos y concentraciones.

Por otro lado, el canal Na_v1.7 también otorga mayor resistencia a la citotoxicidad del compuesto a comparación de las células HEK-WT. A partir de una concentración de 1 μ M hay cambios significativos en la viabilidad celular. Sin embargo, esta resistencia es menor en las células HEK-Na_v1.7 que en las células HEK-K_v10.

Miconazol es capaz de inducir apoptosis a bajas concentraciones (1 μ M).

Como se observa en los resultados de apoptosis, las células HEK-K_v10.1 tanto a una exposición aguda como crónica presenta un número significativo de células apoptóticas incluso a concentraciones bajas de 1 μ M. Por lo que contrasta con los resultados obtenidos en viabilidad celular. Efectivamente, hay un número mayor de células vivas en la línea celular HEK.K_v10.1 que en la línea celular HEK-WT, sin embargo, los resultados de apoptosis indican que las células vivas se encuentran en un estado de apoptosis temprana, por lo que una mayor exposición a miconazol eventualmente culminaría con la muerte de las células.

Resulta interesante que este compuesto ha pasado todas las pruebas de seguridad para su venta y distribución internacional. Y es que este efecto citotóxico no se ha encontrado en otras líneas celulares como epitelios de la piel o de la cavidad oral y vaginal. Por lo que pareciera ser un efecto directo sobre los canales iónicos expresados en el modelo heterólogo HEK.

Miconazol no tiene un efecto sobre el colesterol membranar, por lo que su mecanismo es directo sobre el canal y no sobre la membrana celular

Dado el mecanismo de acción de miconazol sobre la pared celular de los hongos, nos cuestionamos si miconazol tiene un efecto similar sobre células de mamíferos. Para ello realizamos tinciones de colesterol libre por medio del fluoróforo filipina en células tratadas con miconazol a concentraciones cercanas a la IC₅₀ del canal K_v10.1 durante una hora en las líneas celulares HEK-WT, HEK-K_v10.1 y HEK-Na_v1.7. Este experimento mostró que el colesterol permanece intacto tanto en la membrana como en el citosol, por lo que no pareciera alterar directamente a la membrana celular.

Por otro lado, surge ahora la duda de si miconazol tiene la capacidad de internalizar a los canales iónicos en lugar del colesterol membranar. Para ello realizamos inmunoquímicas que permitieron rastrear a los canales tras la incubación durante una hora del miconazol en las diferentes líneas celulares de interés.

Miconazol no internaliza el canal K_v10.1, sin embargo, este efecto se observa en el canal Na_v1.7.

Haciendo contraste con los resultados obtenidos en viabilidad celular, posiblemente el efecto inhibitorio observado en electrofisiología no es debido a cambios membranales, por lo podría existir dos opciones: 1) un efecto de miconazol sobre la membrana celular que desplaza colesterol, mismos que pueden inhibir al mismo canal por medio de la unión de colesterol a los motivos CRAC/CARC; 2) un efecto directo de miconazol sobre los canales iónicos de interés. Es por ello por lo que se marcaron tanto a los canales iónicos como a los lípidos membranales.

En el caso de las células HEK-K_v10.1 incubadas con miconazol a una concentración de 30 μ M no se observa un cambio en la distribución de los canales iónicos ni de los lípidos membranales; a diferencia de las células HEK-Na_v1.7, donde se observa que se internaliza el canal y se desplazan los lípidos membranales hacia el citosol. Esto explica por qué en los ensayos de *patch clamp* no se observan los mismos efectos entre las líneas celulares. Pareciera que se requiere de un mayor tiempo de incubación o perfusión para ver los efectos similares.

Kikuchi et al., describieron por primera vez el efecto inhibitorio de miconazol sobre la línea celular hERG, en el cual realizaron mutaciones en el aminoácido fenilalanina del segmento S6 del canal, en la posición 656, sustituyéndolo por un aminoácido de alanina. Al realizar dicha mutante, observaron que miconazol pierde su efecto inhibitorio en las corrientes de hERG. A partir de los resultados de Kikuchi et al., se compararon las secuencias del segmento S6 en la posición 656 del canal K_v11.1 y K_v10.1, donde encontramos que comparten el aminoácido de fenilalanina, por lo que podría ser este

sitio el responsable de la inhibición del canal Kv10.1, sitio de interés para moléculas pequeñas y su efecto bloqueador de poro.

```
640    FSICVMLIGSLMYASIFGNVSAIIQRLYSGTARYHY 675 S6 KCNH2  
479    FAVAIMMIGSLLYATIFGNVTTIFQQMYANTNRYHE 514 S6 KCNH1
```

Basándose en la alta similitud de los canales Kv11.1 y Kv10.1, parte de los siguientes objetivos del proyecto consisten en realizar simulaciones de acoplamiento molecular para realizar mutantes del canal Kv10.1 en la posición 656 del segmento S6, cambiando el residuo de fenilalanina, de esta manera será posible identificar el sitio de acción de miconazol. Una vez obtenidos los resultados de las simulaciones, realizar mutaciones en el canal iónico y probar mediante electrofisiología que efectivamente se pierde el efecto inhibitorio de miconazol.

13. Conclusiones

1. Los ensayos de fluorescencia de alto rendimiento y que miden cambios en el potencial de membrana permiten la rápida identificación de moléculas con acción sobre el canal iónico $K_v10.1$.
2. De la lista de moléculas pequeñas utilizadas, miconazol resulta de gran interés farmacológico dado que modifica la actividad en el potencial de membrana sobre las células HEK- $K_v10.1$.
3. El miconazol ejerce un efecto inhibitorio sobre el canal $K_v10.1$. Dicho efecto es dependiente de la concentración, obteniendo una IC_{50} cercana a 24 μM .
4. Los ensayos de FLIPR de potencial de membrana resultan poco fiables en la línea celular HEK- $Na_v1.7$, por lo que no es útil para la búsqueda de nuevos moduladores farmacológicos de este canal, y posiblemente de otros.
5. Los ensayos electrofisiológicos en células HEK- $K_v10.1$ y HEK- $Na_v1.7$ tratadas con Miconazol muestran un cambio en la biofísica del canal: en $K_v10.1$ se desplaza el $V_{1/2}$ de activación a valores más positivos (alrededor de 0 mV), al igual que acelera la inactivación del canal y disminuye la conductancia de éste. En el caso del canal $Na_v1.7$, acelera la inactivación dependiente de voltaje, sin embargo, la conductancia permanece intacta.
6. Miconazol tiene un efecto citotóxico en células HEK-WT. No obstante, el canal $K_v10.1$ parece conferir resistencia en las mismas situaciones experimentales.
7. Los ensayos de tinción de colesterol libre, así como los de inmunoquímica, indican que miconazol a 30 μM en la línea celular HEK- $K_v10.1$ no afecta a la composición lipídica de la membrana, ni desplaza al canal; por lo que su efecto inhibitorio es por su interacción directa con el canal $K_v10.1$. Los mismos ensayos realizados en la línea celular HEK- $Na_v1.7$ con miconazol a 30 μM , indican que la composición lipídica de la membrana permanece intacta, sin embargo, hay una internalización del canal, lo cual podría explicar el efecto inhibitorio de miconazol sobre este canal.

14. Trabajo a futuro

El canal HEK-Kv10.1 está involucrado en diferentes procesos fisiológicos y patológicos, el estudio de su dinámica en estudios farmacológicos tiene un papel crucial en la investigación biomédica. Diferentes estudios han identificado moléculas pequeñas que tienen efecto sobre el canal Kv10.1. En este caso, Miconazol presenta potencial para la modulación en la actividad de dicho canal. Para entender más el mecanismo de acción por el cual bloquea al canal se propone realizar mutaciones del canal, particularmente en el segmento S6, debido a las fenestraciones que presenta una vez ensamblado en la membrana.

El canal Kv10.1 y Nav1.7, se encuentran sobreexpresados en diferentes tumores, como el melanoma. Utilizar moduladores farmacológicos de ambos canales presenta una opción viable para el tratamiento de este tipo de cáncer, por lo que realizar ensayos de electrofisiología y funcionales en una línea celular de melanoma sería interesante para el estudio de moduladores farmacológicos como miconazol.

15. Bibliografía

1. Brunton, L. L., Lazo, J. S., Lazo, J. S., Parker, K. L., & Brunton, L. L. (2012). *Comprar Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica 12eD* | Laurence Brunton | 9786071506412 | McGraw-Hill Interamericana. Elsevier, 21-33.
2. Flower, R. J., Henderson, G., Loke, Y. K., MacEwan, D., Rang, H. P. & GEA Consultoría Editorial. (2020). *Rang y Dale. Farmacología* (9.^a ed.). Elsevier.
3. Pandey, P. & Balekar, N. (2018). Target-specific delivery. *Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems*, 117-154. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813689-8.00004-5>
4. Moffat, J. G., Vincent, F., Lee, J. A., Eder, J. & Prunotto, M. (2017). Opportunities and challenges in phenotypic drug discovery: an industry perspective. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(8), 531-543. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.111>
5. Uhl, P., Fricker, G., Haberkorn, U. & Mier, W. (2015). Radionuclides in drug development. *Drug Discovery Today*, 20(2), 198-208. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.09.027>
6. Santos, R., Ursu, O., Gaulton, A., Bento, A. P., Donadi, R. S., Bologa, C. G., Karlsson, A., Al-Lazikani, B., Hersey, A., Oprea, T. I. & Overington, J. P. (2016). A comprehensive map of molecular drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(1), 19-34. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.230>
7. Hutchings, C. J., Colussi, P. & Clark, T. G. (2018). Ion channels as therapeutic antibody targets. *mAbs*, 11(2), 265-296. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1548232>
8. Jung, H. J. & Kwon, H. J. (2015). Target deconvolution of bioactive small molecules: the heart of chemical biology and drug discovery. *Archives of Pharmacal Research*, 38(9), 1627-1641. <https://doi.org/10.1007/s12272-015-0618-3>
9. Bell, D. C., Leanza, L., Gentile, S., & Sauter, D. (2023). News and views on ION channels in Cancer: Is cancer a channelopathy? *Frontiers in Pharmacology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1258933>
10. Voet, D., Voet, J. G. & Pratt, C. W. (2016). *Fundamentos De Bioquímica: La vida a nivel molecular* (4.^a ed.). Editorial Médica Panamericana, S.A. De C.V.
11. Hubner, C. A. (2002). Ion channel diseases. *Human Molecular Genetics*, 11(20), 2435-2445. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.20.2435>

12. Purves, D. (2020). *Neurociencia (Incluye Versión Digital)* (5.^a ed.). Editorial Médica Panamericana, S.A. De C.V.
13. Kandel, E., Koester, J. D., Mack, S. H. & Siegelbaum, S. (2021). *Principles of Neural Science* (6th ed.). McGraw Hill / Medical.
14. Kornreich, B. G. (2007). The patch clamp technique: Principles and technical considerations. *Journal of Veterinary Cardiology*, 9(1), 25-37. <https://doi.org/10.1016/j.jvc.2007.02.001>
15. Dallas, M. & Bell, D. (2020). *Patch Clamp Electrophysiology: Methods and Protocols: 2188* (2021 ed.). Humana.
16. Covey, P. E. & Carter, P. M. (2015). *Basic Electrophysiological Methods* (Illustrated). Oxford University Press, USA.
17. Gao, J., Liao, C., Liu, S., Xia, T. & Jiang, G. (2021). Nanotechnology: new opportunities for the development of patch-clamps. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00841-4>
18. Hille, B. 2001. *Ion Channels of Excitable Membranes*. Third edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA. 814 pp.
19. Kaczorowski, G. J., McManus, O. B., Priest, B. T., & Garcia, M. L. (2008). Ion Channels as Drug Targets: The Next GPCRs. *Journal of General Physiology*, 131(5), 399–405. <https://doi.org/10.1085/jgp.200709946>
20. Baxter, D. F., Kirk, M., Garcia, A. F., Raimondi, A., Holmqvist, M. H., Flint, K. K., Bojanic, D., Distefano, P. S., Curtis, R., & Xie, Y. (2002). A Novel Membrane Potential-Sensitive Fluorescent Dye Improves Cell-Based Assays for Ion Channels. *SLAS Discovery*, 7(1), 79–85. <https://doi.org/10.1177/108705710200700110>
21. Gill, S., Gill, R., Lee, S. S., Hesketh, J. C., Fedida, D., Rezazadeh, S., Stankovich, L., & Liang, D. (2003). Flux Assays in High Throughput Screening of Ion Channels in Drug Discovery. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 1(5), 709–717. <https://doi.org/10.1089/154065803770381066>
22. Yu, H. B., Li, M., Wang, W. P. & Wang, X. L. (2015). High throughput screening technologies for ion channels. *Acta Pharmacologica Sinica*, 37(1), 34-43. <https://doi.org/10.1038/aps.2015.108>
23. Chhabra, M. (2021). Biological therapeutic modalities. *Translational Biotechnology*, 137-164. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821972-0.00015-0>

24. Wolff, C., Fuks, B., & Chatelain, P. (2003). Comparative Study of Membrane Potential-Sensitive Fluorescent Probes and their Use in Ion Channel Screening Assays. *SLAS Discovery*, 8(5), 533–543. <https://doi.org/10.1177/1087057103257806>
25. González, J. E. & Maher, M. P. (2002). Cellular Fluorescent Indicators and Voltage/Ion Probe Reader (VIPR TM): Tools for Ion Channel and Receptor Drug Discovery. *Receptors and Channels*, 8(5-6), 283-295. <https://doi.org/10.3109/10606820214644>
26. Sarkar, I. & Mishra, A. K. (2017). Fluorophore tagged bio-molecules and their applications: A brief review. *Applied Spectroscopy Reviews*, 53(7), 552-601. <https://doi.org/10.1080/05704928.2017.1376680>
27. Xu, J., Wang, X., Ensign, B., Li, M., Wu, L., Guia, A. & Xu, J. (2001). Ion-channel assay technologies: quo vadis? *Drug Discovery Today*, 6(24), 1278-1287. [https://doi.org/10.1016/s1359-6446\(01\)02095-5](https://doi.org/10.1016/s1359-6446(01)02095-5)
28. Chen, M. X., Gattfield, K., Ward, E., Downie, D., Sneddon, H. F., Walsh, S., Powell, A. J., Laine, D., Carr, M. & Trezise, D. (2015). Validation and Optimization of Novel High-Throughput Assays for Human Epithelial Sodium Channels. *SLAS Discovery*, 20(2), 242-253. <https://doi.org/10.1177/1087057114552399>
29. Yun Zhang. (2015). Why do we study animal toxins? *Dongwuxue yanjiu*, 36(4), 183-222. <https://doi.org/10.13918/j.issn.2095-8137.2015.4.183>
30. Zambelli, V., Pasqualoto, K., Picolo, G., Chudzinski-Tavassi, A. & Cury, Y. (2016). Harnessing the knowledge of animal toxins to generate drugs. *Pharmacological Research*, 112, 30-36. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.009>
31. Smith, C. G. & Vane, J. R. (2003). The Discovery of Captopril. *The FASEB Journal*, 17(8), 788-789. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0093life>
32. Gilchrist, J., Olivera, B. M. & Bosmans, F. (2014). Animal Toxins Influence Voltage-Gated Sodium Channel Function. *Voltage Gated Sodium Channels*, 203-229. https://doi.org/10.1007/978-3-642-41588-3_10
33. Kozlov, S. (2018). Animal toxins for channelopathy treatment. *Neuropharmacology*, 132, 83-97. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.10.031>
34. SHARMA, S. & UPADHYAY, R. K. (2022). THERAPEUTICS APPROACHES OF INVERTEBRATE ANIMAL TOXINS: A REVIEW. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8-18. <https://doi.org/10.22159/ijpps.2022v14i9.45520>

35. Shen, H., Li, Z., Jiang, Y., Pan, X., Wu, J., Cristofori-Armstrong, B., Smith, J. J., Chin, Y. K. Y., Lei, J., Zhou, Q., King, G. F. & Yan, N. (2018). Structural basis for the modulation of voltage-gated sodium channels by animal toxins. *Science*, 362(6412). <https://doi.org/10.1126/science.aau2596>
36. Oliveira, A. L., Viegas, M. F., da Silva, S. L., Soares, A. M., Ramos, M. J. & Fernandes, P. A. (2022). The chemistry of snake venom and its medicinal potential. *Nature Reviews Chemistry*, 6(7), 451-469. <https://doi.org/10.1038/s41570-022-00393-7>
37. Luis, E., Anaya-Hernández, A., León-Sánchez, P. & Durán-Pastén, M. L. (2022). The Kv10.1 Channel: A Promising Target in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), 8458. <https://doi.org/10.3390/ijms23158458>
38. Gómez-Herrera, M. A., Patlán, E., Estrada-Garrido, A., Hernández-Cruz, A., & Luis, E. (2023b). Fluorescent membrane potential assay for drug screening on KV10.1 channel: Identification of BL-1249 as a channel activator. *Frontiers in Pharmacology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1238503>
39. Hameed, S. (2019). Nav1.7 and Nav1.8: Role in the pathophysiology of pain. *Molecular Pain*, 15, 174480691985880. <https://doi.org/10.1177/1744806919858801>
40. Kowalska, M., Nowaczyk, J. & Nowaczyk, A. (2020). KV11.1, Nav1.5, and Cav1.2 Transporter Proteins as Antitarget for Drug Cardiotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 8099. <https://doi.org/10.3390/ijms21218099>
41. Gutierrez, E. (2022). *Activación del canal oncológico de K⁺ Kv10.1: papel sobre la proliferación, migración y viabilidad de células con propiedades tumorales*. Universidad Nacional Autónoma de México.
42. Kikuchi, K., Nagatomo, T., Abe, H., Kawakami, K., Duff, H. J., Makielski, J. C., January, C. T. & Nakashima, Y. (2005). Blockade of HERG cardiac K⁺ current by antifungal drug miconazole. *British Journal of Pharmacology*, 144(6), 840-848. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706095>
43. Pozdnyakov, I., Safonov, P., & Skarlato, S. (2020). Diversity of voltage-gated potassium channels and cyclic nucleotide-binding domain-containing channels in eukaryotes. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74971-4>
44. Shen, H., Liu, D., Wu, K., Lei, J., & Yan, N. (2019). Structures of human Na⁺ v 1.7 channel in complex with auxiliary subunits and animal toxins. *Science*, 363(6433), 1303-1308. <https://doi.org/10.1126/science.aaw2493>

45. Tikhonov, D. B., & Zhorov, B. S. (2022). P-Loop Channels: Experimental Structures, and Physics-Based and Neural Networks-Based Models. *Membranes*, 12(2), 229. <https://doi.org/10.3390/membranes12020229>
46. He, L., Yu, Z., Geng, Z., Huang, Z., Zhang, C., Dong, Y., Gao, Y., Wang, Y., Chen, Q., Sun, L., Ma, X., Huang, B., Wang, X., & Zhao, Y. (2022). Structure, gating, and pharmacology of human CaV3.3 channel. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29728-0>
47. Rodríguez, R. Z., Aguilar, D. T., & Landa, Á. R. T. (2007). El maravilloso mundo de los hongos. En *Universidad Veracruzana eBooks*. <http://cdigital.uv.mx/handle/123456789/34583>
48. Zákány, F., Pap, P., Papp, F., Kovács, T., Nagy, P., Péter, M., Szente, L., Panyi, G., & Varga, Z. (2019). Determining the target of membrane sterols on voltage-gated potassium channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1864(3), 312-325. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.12.006>
49. Zákány, F., Kovács, T., Panyi, G., & Varga, Z. (2020). Direct and indirect cholesterol effects on membrane proteins with special focus on potassium channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1865(8), 158706. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158706>
50. De Nollin, S., & Borgers, M. (2009). An ultrastructural and cytochemical study of candida Albicans after in vitro treatment with imidazoles. *Mycoses*, 19(9), 317-328. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1976.tb01469.x>
51. Pierard, G., Hermanns-Lê, T., Delvenne, P., & Piérard-Franchimont, C. (2012). Miconazole, a pharmacological barrier to skin fungal infections. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 13(8), 1187-1194. <https://doi.org/10.1517/14656566.2012.687047>
52. Shafiei, M., Peyton, L., Hashemzadeh, M., & Foroumadi, A. (2020). History of the development of Antifungal azoles: A review on Structures, SAR, and mechanism of action. *Bioorganic Chemistry*, 104, 104240. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104240>
53. Kim, J. (2014). Channelopathies. *Korean Journal Of Pediatrics/Korean Journal Of Pediatrics*, 57(1), 1. <https://doi.org/10.3345/kjp.2014.57.1.1>
54. Minett, M. S., Falk, S., Santana-Varela, S., Bogdanov, Y. D., Nassar, M. A., Heegaard, A., & Wood, J. N. (2014). Pain without Nociceptors? Nav1.7-Independent Pain Mechanisms. *Cell Reports*, 6(2), 301-312. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.033>

55. Moreau, A., Gosselin-Badaroudine, P., & Chahine, M. (2014). Biophysics, pathophysiology, and pharmacology of ion channel gating pores. *Frontiers In Pharmacology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00053>

17. Anexos

17.1 Lista de compuestos y solventes utilizados

Tabla 2. Lista de moléculas pequeñas, y la concentración utilizada para los experimentos.

Total	Compuesto	Soluble en	Concentración utilizada [μM]
1	Benidipine hydrochloride	DMSO	100
2	Cilnidipine	DMSO/Etanol	100
3	FTX-3.3	Buffer acuoso	100
4	Miconazole nitrate	DMSO/Etanol	100
5	ML 218	DMSO	100
6	ML 218 Hydrochloride	DMSO/Etanol	100
7	NNC 55-0396 dyhydrochloride	Agua	100
8	NS-6180	DMSO/Etanol	100
9	NS8593	DMSO	100
10	Paxilline	DMSO/Etanol	100
11	PD 173212	DMSO	100
12	RY796	DMSO	100
13	SKF 96365 hydrochloride	Agua	100
14	sFTX-3.3	Buffer acuoso	50
15	TRAM 34	DMSO	100
16	TTA-A2	DMSO	100
17	Verruculogen	DMSO/Metanol /Acetona	100

17.2 Posiciones energéticamente más probables de miconazol con el canal iónico Kv11.1, ordenadas de mayor a menor

Tabla 3. Parámetros obtenidos por AutoDock para la interacción de miconazol con el canal iónico Kv11.1.

Estado	Afinidad (kcal/mol)	Distancia media cuadrática mínima (l.b)	Distancia media cuadrática mínima (u.b)
1	-5.2	0.00	0.00
2	-5.1	2.52	4.60
3	-4.9	2.98	6.16
4	-4.8	1.68	5.54
5	-4.8	3.40	7.02
6	-4.7	3.64	6.43
7	-4.6	3.19	6.20
8	-4.6	2.05	2.70
9	-4.2	3.3	6.95

17.3 Posiciones energéticamente más probables de miconazol con el canal iónico Kv10.1, ordenadas de mayor a menor

Tabla 4. Parámetros obtenidos por AutoDock para la interacción de miconazol con el canal iónico Kv10.1.

Estado	Afinidad (kcal/mol)	Distancia media cuadrática mínima (l.b)	Distancia media cuadrática mínima (u.b)
1	-5.6	0.00	0.00
2	-5.4	2.36	4.57
3	-4.8	2.11	5.18
4	-4.8	1.71	5.73
5	-4.7	3.11	6.21
6	-4.6	3.09	6.72
7	-4.5	2.16	4.81
8	-4.4	2.00	2.38
9	-4.2	3.71	5.11