



Universidad Nacional Autónoma de México

---

---

Facultad de Ciencias

***Efecto modulador de la chaperona Sigma-1 sobre los canales iónicos dependientes de voltaje  $Na_v1.7$  y  $K_v10.1$***

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

MARTHA ELIZABETH MEDINA SILVA

TUTOR

DR. ENOCH LUIS BALTAZAR



Ciudad Universitaria, CDMX, 2024



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

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



Este trabajo fue realizado con el apoyo del proyecto financiado por CONACYT CB-2017/2018-A1-S-13646 y con beca con número de referencia 31245. El Dr. Enoch Luis Baltazar es responsable técnico del proyecto.

## **Agradecimientos Institucionales**

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

A la Dra. **María Luisa 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, en particular a **Ana María Escalante Gonzalbo** y **Francisco Pérez Eugenio**.

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

## Índice

Resumen .....	6
1.1 Los canales iónicos .....	7
1.2 Canales iónicos dependientes de voltaje .....	8
1.3 Canal dependiente de voltaje KV10.1 .....	9
1.3.1 Expresión .....	9
1.3.2 Estructura .....	9
1.3.3 Biofísica .....	10
1.3.4 Farmacología.....	11
1.3.5 Papel de KV10.1 en la fisiología y fisiopatología .....	12
1.3.6 Canalopatías de KV10.1 .....	13
1.4 Canal dependiente de voltaje NaV1.7.....	14
1.4.1 Expresión .....	14
1.4.2 Estructura .....	14
1.4.3 Biofísica .....	15
1.4.4 Farmacología.....	15
1.4.5 Papel de NaV1,7 en la Fisiología y Fisiopatología .....	16
1.4.6 Canalopatías .....	17
1.5.1 Modulación de canales iónicos por Sig1R.....	21
1.5.2 Farmacología del Sig1R .....	23
1.6 Compuesto SA4503.....	24
1.7 Compuesto BD1047 .....	25
2. JUSTIFICACIÓN.....	26
4. OBJETIVOS.....	28
4.1 Objetivo general.....	28
4.2 Objetivos particulares .....	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
5.1 Cultivos celulares: .....	29
5.2 Electrofisiología .....	29
5.3 Ensayo de viabilidad.....	32
5.4 Ensayo de Invasividad.....	33
5.5 Inmunofluorescencia .....	34
5.6 Moléculas.....	34
5.7 Análisis .....	34
6.RESULTADOS .....	36
6.1 La chaperona Sig1R se expresa en células HEK WT.....	36

6.2 Modulación farmacológica del receptor Sig1R y su efecto sobre el canal KV10.1 ...	36
6.2.1 Efecto de SA4503 y BD1047 tras 24 H de incubación sobre las corrientes generadas por el canal KV10.1.....	37
6.2.2 Efecto de SA4503 Y BD1047 después de 48 H sobre las corrientes generadas por el canal KV10.1.....	39
6.3 Modulación farmacológica del receptor Sig1R y su efecto sobre el canal NaV1.7 ..	42
6.3.1 Efecto de SA4503 después de 24 H sobre las corrientes generadas por el canal NaV1.7.....	42
6.3.2 Efecto de SA4503 después de 48 H sobre las corrientes generadas por el canal NaV1.7.....	44
6.4 Efecto de las moléculas SA4503 y BD1047 sobre la viabilidad y morfología celular	46
6.4.1 Efecto de SA4503 Y BD1047 sobre la viabilidad de células HEK-WT después de 24 H de tratamiento.....	47
6.4.2 Efecto de SA4503 Y BD1047 después de 24 H sobre la viabilidad de células HEK-NaV1.7.....	48
6.4.3 Efecto de SA4503 Y BD1047 después de 24 H sobre la viabilidad de células HEK-KV10.1 .....	50
6.4.4 Efecto de SA4503 Y BD1047 sobre la morfología celular de las líneas celulares HEK-WT, HEK-KV10.1 Y HEK-NaV1.7 .....	53
6.5 Efecto de SA4503 y BD1047 sobre la Invasividad celular de las células HEK-WT, HEK-KV10.1 y HEK-NaV1.7 .....	55
7. Discusión .....	60
8. Conclusiones.....	65
9. Bibliografía .....	66

## Resumen

El desarrollo de fármacos con blanco de acción sobre canales iónicos es cada vez más recurrido; esto debido a que existen muchas enfermedades que se encuentran relacionadas con un comportamiento anómalo de dichas proteínas.

En los últimos años, se ha demostrado que canales iónicos como el Kv10.1 y Nav1.7 se encuentran sobreexpresados y juegan un papel primordial en la malignidad de algunos tipos de cáncer. En específico el canal de potasio activado por voltaje Kv10.1 juega un papel activo en la progresión maligna del cáncer en donde tiene un papel importante en el ciclo celular y la proliferación. Por su parte el canal de sodio activado por voltaje Nav1.7, además de verse involucrado en los procesos de nocicepción y estar fuertemente relacionado con las patologías del dolor, está asociado con la motilidad celular y el comportamiento metastásico de células cancerígenas.

En esta búsqueda de nuevas vías de regulación sobre canales iónicos se ha encontrado que el receptor Sigma-1 puede ser un buen blanco farmacológico, pues Sig1R es capaz de interactuar con una gran variedad de canales iónicos modulando así su actividad. Es por ello por lo que el objetivo de esta tesis se centró en estudiar si la modulación farmacológica del receptor Sigma-1 era capaz de modular canales como lo son Kv10.1 y Nav1.7 en células HEK-293 transfectadas con estos canales. A partir de registros electrofisiológicos, ensayos de viabilidad celular, morfología celular e invasividad celular en modelos de líneas celulares con expresión de estos canales se pudo observar que tanto el agonista (SA4503) y antagonista (BD1047) de Sigma-1, produjeron efectos sobre algunas de las características de la biofísica del canal Kv10.1 como lo son la densidad de corriente y la  $V_{1/2}$  de activación, disminuyendo su actividad. Ambos compuestos aumentaron la mortalidad en los ensayos de viabilidad celular y produjeron cambios en la morfología celular, pasando de morfología mesenquimal a células epiteliales, sin observar cambios en la invasividad celular. Por el contrario, los moduladores de Sigma-1 no tuvieron efecto sobre la densidad de corriente del Nav1.7, no se presentaron cambios en la viabilidad celular, ninguna de las moléculas afectó la morfología de las células HEK-Nav1.7 y no fueron capaces de provocar cambios en la invasividad celular.

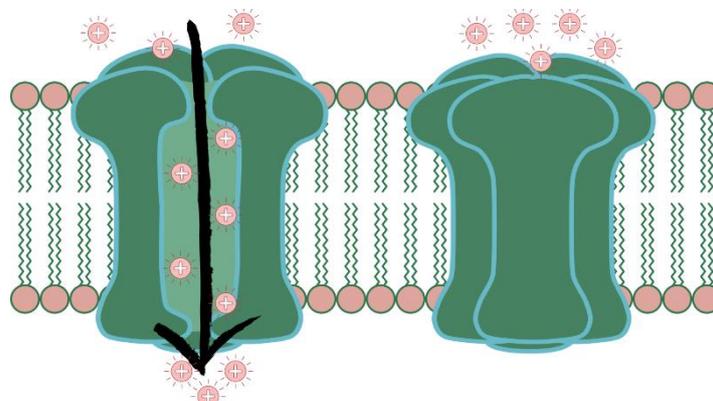
Estos datos sugieren que la modulación de Sigma-1 sobre el canal Kv10.1 resulta en una herramienta farmacológica interesante, tanto para los estudios biofísicos del canal, como por su papel de éste en la biología del cáncer.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Los canales iónicos

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana especializadas en permitir el paso de iones de un lado de la membrana plasmática de la célula al otro. Pueden estar formados por una sola proteína (subunidad) o de varias de ellas, constituyendo así complejos macromoleculares. Estos controlan el flujo de iones de manera rápida y selectiva a través de las membranas celulares, mantienen el potencial de membrana de reposo y median los potenciales de acción en células excitables (Catterall et al., 1992; Rosas, 2004; Barker et al., 2017).

Los canales iónicos actúan como poros para la difusión pasiva de iones a través de las membranas biológicas, ya sea hacia el interior o hacia el exterior de la célula; cuando se expresan en organelos intracelulares el movimiento de iones puede ser hacia el citosol o del citosol hacia el lumen de los organelos, en ambos casos la dirección que sigue está en función del gradiente electroquímico de cada ion. Los canales adoptan diferentes estados conformacionales, los cuales se pueden dividir en dos: un estado conductor (abierto) que permite el movimiento de iones y un estado no conductor (cerrado e inactivo) que no permite el flujo iónico (Figura 1). Las probabilidades de cierre y apertura de los canales iónicos son controladas por estímulos eléctricos, químicos y físicos. Por lo tanto, hay canales activados por voltaje, por ligandos químicos, activados por tensión o estiramiento y canales activados por temperatura. Además, los canales pueden estar regulados por calcio, cambios en el pH, fosforilación y lípidos de membrana, lo que incrementa sus vías de regulación. A menudo, los canales iónicos son altamente selectivos para una especie iónica en particular, lo que lleva a clasificarlos como canales de sodio ( $\text{Na}^+$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ), calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) y canales catiónicos inespecíficos. La dirección del transporte neto de iones cuando el canal está abierto depende del gradiente electroquímico de las especies iónicas relevantes (Catterall et al., 1992; Hübner et al, 2022).

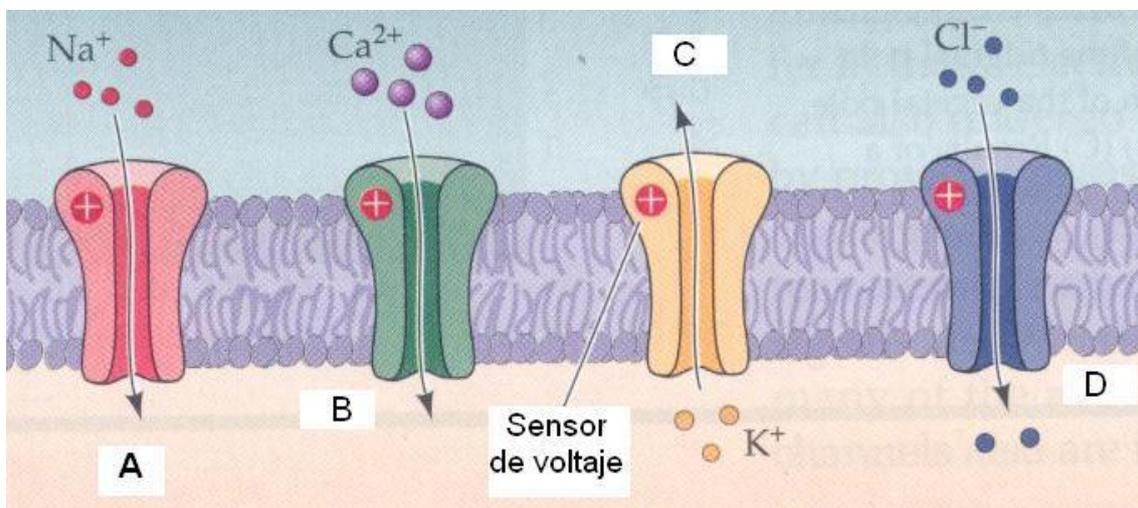


**Figura 1.** Apertura y cierre de los canales iónicos. Cuando un canal está abierto se considera que está en un estado “conductor” en el cual se permite el movimiento de iones, mientras que el cerrado se considera que está en un estado “no conductor”.

## 1.2 Canales iónicos dependientes de voltaje

Los canales iónicos dependientes de voltaje como su nombre lo indica son activados por cambios en el potencial de membrana de la célula. En mamíferos los canales iónicos dependientes de voltaje determinan importantes procesos como: la secreción de hormonas y neurotransmisores, la transducción sensorial, el control del equilibrio hídrico y electrolítico, la regulación de la presión sanguínea, la proliferación celular, los procesos de aprendizaje y memoria, así como la generación de potenciales de acción en células excitables (p.ej. neuronas y músculo) (Bezanilla, 2000; Gandhi et al, 2002; Martínez, 2004).

En 1952, los fisiólogos Alan Hodgkin y Andrew Huxley realizaron varios experimentos con el objetivo de describir cómo se propaga el potencial de acción en las células nerviosas, dando como resultado el modelo de Hodgkin-Huxley el cual es un sistema de cuatro ecuaciones diferenciales no lineales que describen con gran exactitud la transmisión del impulso nervioso, así mismo, describieron la base de inicio de los potenciales de acción. Este sistema logra describir no solo cualitativamente, sino también cuantitativamente, la transmisión del potencial de acción en el axón gigante del calamar, lo que permitió incluso predecir la existencia de los canales iónicos (Hodgkin et al., 1952; Börgers, 2017; Bezanilla, 2000).



**Figura 2.** Tipos de canales iónicos activados por voltaje. Los ejemplos de canales dependientes de voltaje incluyen aquellos selectivamente permeables a (A)  $\text{Na}^+$ , (B)  $\text{Ca}^{2+}$ , (C)  $\text{K}^+$  y (D)  $\text{Cl}^-$ . Obtenido de Purves et al, 2013.

Se conocen canales iónicos dependientes de voltaje permeables selectivamente para cada uno de los principales iones fisiológicos; esta selectividad iónica es determinada por secuencias únicas y conservadas de aminoácidos que se encuentran en una región del canal conocido como filtro de selectividad y es gracias a esto que encontramos las tres familias principales de estos canales

que son expresados en células de mamíferos: Nav, Kv y Cav en donde “v” denota su actividad dependiente de voltaje (Figura2) (Doyle et al., 1998; Hille,2001).

En mamíferos existen alrededor de 350 canales iónicos diferentes, de los cuales un poco más de 140 son canales iónicos activados por voltaje (Ranjan et al., 2019). En la presente tesis nos enfocaremos únicamente en el canal de K<sup>+</sup> Kv10.1 y el de Na<sup>+</sup> Nav1.7 (Mortimer et al., 2009; Lipscombe et al., 2014; De Lera Ruiz et al., 2015).

### 1.3 Canal dependiente de voltaje Kv10.1

La superfamilia de canales de potasio activados por voltaje está conformada por al menos 40 miembros, los cuales de acuerdo con el su grado de homología en su secuencia de aminoácidos se dividen en 12 subfamilias (Kv1-Kv12). En el caso del Kv10.1 este pertenece a la subfamilia de canales de eter-à-go-go (EAG) la cual está conformada por 8 miembros: Kv10.1, Kv10.2, Kv11.1, Kv11.2, Kv11.3, Kv12.1, Kv12.2 y Kv12.3 (Bauer et al., 2018).

#### 1.3.1 Expresión

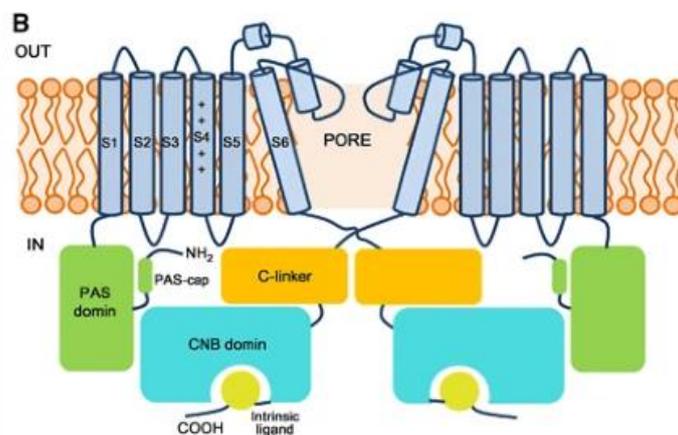
La proteína humana éter-à-go-go1 (Eag1 o Kv10.1, codificada por el gen *KCNH1*) es un canal que fue descrito por primera vez en un cribado de mutaciones en *Drosophila melanogaster* con un fenotipo de hiperexcitabilidad, la cual sacudía las patas cuando eran anestesiadas con éter (Pardo et al, 2005; Kaplan et al., 1969).

La evidencia a través de estudios moleculares y funcionales (ej., electrofisiología) corroboran que el Kv10.1 es un canal expresado en la membrana plasmática, siendo en humanos detectable en cerebro, riñón, pulmón, testículos y páncreas. En el cerebro, se expresan en la corteza, el hipocampo, el caudado, el putamen y la amígdala (Martin et al., 2008). Sin embargo, la expresión ectópica de Kv10.1 se ha relacionado cada vez más con el proceso de carcinogénesis y la progresión tumoral. La sobreexpresión de este induce un fenotipo con características de células tumorigénicas. Además, el mRNA y su producto se han detectado en numerosas líneas celulares de cáncer y en muestras de tumores primarios, es por lo que muchos estudios sobre el canal Kv10.1 y el cáncer lo han propuesto como un marcador tumoral o bien como un blanco molecular en varios tipos de cáncer (Downie, et al., 2008; Ouadid et al., 2016; Camacho, 2006; Barros et al., 2020; Bauer et al., 2001; Chen et al., 2011).

#### 1.3.2 Estructura

Al igual que otros canales Kv, Kv10.1 tiene seis hélices transmembrana en donde los primeros cuatro segmentos (de S1 a S4) constituyen el dominio sensor de voltaje, y los últimos dos segmentos (S5 y S6) forman el poro selectivo a potasio, siendo una característica común de esta subfamilia y que los hace diferentes a

otros  $K_v$ , es que los extremos amino (N-) y carboxilo (C-) son muy grandes y contienen muchos dominios o sitios de modulación. En la región N- terminal posee una región conservada en todos los miembros de la subfamilia, por lo que se denomina dominio *eag*, el cual se encuentra muy cerca de otra región denominada PAS (Per-ARNT-Sim), por lo que estas regiones son llamadas en su conjunto dominio *eag*/PAS, en el extremo C- terminal se encuentran un dominio *C-enlazador* y un dominio homólogo de unión a nucleótidos cíclicos (CNBHD, por sus siglas inglés) (Figura3). En la región extracelular del canal existe una región denominada “torreta” que tiene dos sitios de glicosilación y que también se ha observado en el canal  $K_v11.1$  (hERG). Parte de la “torreta” forma una hélice, que se posiciona paralela a la membrana e interactúa con el S6. En esta posición, la cadena de azúcares rodea la abertura extracelular del poro formando un impedimento estérico que parece prevenir la unión de toxinas inhibitoras de tipo bloqueadoras de poro y que explicaría porque hay pocas toxinas con efecto sobre el canal  $K_v10.1$  (Barros et al., 2020; Whicher et al., 2016; Wang et al., 2017). Un canal funcional se conforma por el ensamble de 4 subunidades idénticas.



**Figura 3.** Ilustración de los principales dominios estructurales en el canal  $K_v10.1$ . Los dominios transmembrana están en azul claro, los dominios PAS están en verde, los enlazadores C están en naranja y los dominios CNBHD están en cian. Los motivos de ligandos intrínsecos están resaltados en amarillo. Obtenido de Wang et al., 2017.

### 1.3.3 Biofísica

Los estudios electrofisiológicos muestran que el canal  $K_v10.1$  es activado por la despolarización del potencial de membrana en reposo de las células, y que las corrientes generadas por la apertura del canal son del tipo rectificantes de salida, esto quiere decir que cuando se obtienen curvas del tipo corriente vs voltaje se aprecia una mayor amplitud de corriente a voltajes positivos que a voltajes negativos. La activación del canal  $K_v10.1$  genera corrientes iónicas con una cinética de activación relativamente lenta y que no muestran inactivación. Una característica especial que presenta el  $K_v10.1$  es que su tasa de activación es directamente proporcional al potencial de fijación antes del pulso despolarizante,

es decir, entre más despolarizado es el voltaje de fijación la tasa de activación es más rápida (Bauer et al., 2001; Wang et al., 2017; Whicher et al., 2016).

En *Drosophila melanogaster* la conductancia unitaria del canal se ha reportado de 4.9 pS, mientras que en mioblastos humanos de 8.3 pS. Por otra parte, el potencial medio de activación ( $V_{1/2}$ ) del canal Eag1 humano es de alrededor de 8.3 mV (Brüggemann et al., 1993; Stansfeld et al., 1993; Kortüm et al., 2015).

#### 1.3.4 Farmacología

Los miembros de la familia EAG presentan una alta homología, por ello no ha sido fácil encontrar un bloqueador selectivo de Kv10.1 y si bien se han descrito varios bloqueadores de Kv10.1 estos suelen ser poco específicos. Algunas moléculas como la imipramina, mibefradil, terfenadina, loperamida, fluoxetina, astemizol, entre otros, muestran un efecto inhibitor sobre la actividad de Kv10.1. Este último originalmente fue usado como un anti-histaminérgico y posteriormente como un bloqueador del canal Kv10.1, siendo capaz de atravesar la membrana celular y bloquear al canal desde el lado intracelular (Brüggemann et al., 1993; Loza-Huerta et al., 2021; Gavrilova et al., 2002; García et al., 2011; Gómez et al., 2017; Pardo et al., 2014).

Además de los antagonistas o inhibidores, el uso de agonistas o activadores de canales Kv, son una herramienta indispensable para conocer más sobre las propiedades biofísicas y papel funcional de estos canales en donde están siendo expresados. Dentro de ellos, nuestro grupo de investigación describió el primer *opener* del canal Kv10.1, la molécula BL-1249, la cual modifica el  $V_{1/2}$  de activación, desplazándolo a la dirección hiperpolarizante (Gómez-Herrera et al., 2023). Otra estrategia farmacológica ha sido el uso de anticuerpos monoclonales contra canales iónicos, los cuales reconocen regiones extracelulares del mismo; en este sentido, el anticuerpo monoclonal contra el canal Kv10.1, mAb56, mostró inhibir al canal de forma bastante potente, el cual a diferencia de las moléculas pequeñas, este anticuerpo no tiene efecto sobre otros canales de  $K^+$ , como pueden ser el Kv10.2 y Kv11.1, los cuales tienen una estructura muy parecida al canal Kv10.1 (Gómez-Varela et al., 2007).

Debido a las propiedades oncogénicas del canal Kv10.1, diversos inhibidores de este han sido ensayados en modelos *in vitro* e *in vivo* investigando su papel en las propiedades tumorales. Un ejemplo es el caso de la cloroquina, la cual bloquea a los canales Kv10.1 y que en células de cáncer de mama MDA-MB-231 disminuye la migración celular. También se ha encontrado que el ácido 2-hidroxioléico (2OHOA) actúa sinérgicamente con astemizol para disminuir la proliferación celular de manera eficiente (Valdés-Abadía et al., 2019; Morán-Zendejas et al., 2023).

### 1.3.5 Papel de Kv10.1 en la fisiología y fisiopatología

En mamíferos adultos, el canal Kv10.1 se expresa en ciertas áreas del sistema nervioso central tales como el bulbo olfatorio, corteza cerebral e hipocampo; de la misma manera, en ratas adultas se ha encontrado en el cerebelo. El uso de animales transgénicos con delección del gen que codifica para el Kv10.1 ha permitido demostrar que la falta de expresión de este gen no altera el desarrollo y la conducta de dichos animales (Ufartes et al., 2013). No obstante, por medio de registros electrofisiológicos se ha demostrado que los canales Kv10.1 son importantes para regular la descarga neuronal de alta frecuencia en determinadas sinapsis (Cázares-Ordoñez et al., 2017). Aunado a esto, en humanos se han descrito síndromes que se originan por mutaciones de ganancia de función del canal Kv10.1 que impactan el desarrollo cognitivo de los sujetos que las padecen (Bo et al., 2017).

Actualmente se conoce que Kv10.1 juega un papel activo en la progresión maligna y no es simplemente una consecuencia del desarrollo del tumor, de ahí que sea conocido como un canal oncogénico (Ouadid et al., 2016). Se ha identificado que el nivel de metilación del gen *KCNH1* es más de tres veces mayor en las muestras de carcinoma gástrico en comparación con tejido sano, lo que sugiere que la hipermetilación de *KCNH1* puede desempeñar un papel en el desarrollo del carcinoma gástrico (Liu et al., 2014). Por otro lado, la expresión del canal Kv10.1 también está regulada por otros factores asociados con el cáncer, incluidos los receptores de estrógeno y los oncogenes del virus del papiloma humano (VPH). Además, las células de cáncer de cuello uterino y los queratinocitos que expresan oncogenes de VPH mostraron expresión de Kv10.1 en contraste con los queratinocitos normales (Ouadid et al., 2016). Por otro lado, Kv10.1 se expresa en la membrana interna de la envoltura nuclear donde interactúa con el material genético y contribuye a la regulación de la concentración nuclear de los iones de potasio, procesos que podrían impactar en los genes en cuanto a la expresión, la estabilidad del genoma o la senescencia celular (Ouadid et al., 2016; Chen et al., 2011).

Los iones K<sup>+</sup> juegan un papel importante en muchos procesos celulares estando involucrados en el ciclo celular y la proliferación. La observación inicial de que los bloqueadores de los canales de potasio de amplio espectro inhiben la proliferación se ha confirmado repetidamente en muchos tejidos y tipos de célula (Urrego et al., 2014). Diferentes tipos de canales de potasio muestran variaciones de expresión o actividad dependientes del ciclo celular, la despolarización del potencial de membrana parece esencial en la fase G1 temprana, y la hiperpolarización parece importante para la transición de la fase G1 a la fase S durante la mitosis (Luis et al., 2022) así mismo se han descrito observaciones similares, donde se propuso el potencial de membrana como regulador del ciclo celular, y muestra que las células de rápida proliferación (p. ej., células cancerosas) están más despolarizadas, mientras que las células con

potencial de membrana hiperpolarizado (p. ej., neuronas) no muestran actividad mitótica (Cone, 1971). Por otro lado, se ha sugerido que el punto de control G<sub>1</sub>/S está regulado por canales de potasio, ya que la inhibición o una disminución en los niveles de expresión de canales de potasio provocan la detención celular en G<sub>1</sub>. En el caso del canal Kv10.1, se ha planteado la hipótesis de que su activación provoca un aumento de la fuerza impulsora de la entrada de calcio, aumentando la concentración citoplasmática de calcio y provocando el desmontaje del cilio primario, que es un paso necesario para iniciar la mitosis (Urrego et al., 2014; Rosendo et al., 2020).

### 1.3.6 Canalopatías de Kv10.1

La actividad disminuida o aumentada de los canales de potasio causada por la expresión de variantes de pérdida de función o ganancia de función en los genes correspondientes es causante de una amplia gama de trastornos humanos que afectan la función del sistema nervioso central, el corazón, los riñones y otros órganos. Se ha encontrado que mutaciones heterocigotas sin sentido en *KCNH1* producen una ganancia de función del Kv10.1 y son relacionadas con el síndrome de Zimmermann-Laband el cual es un trastorno del desarrollo caracterizado por dimorfismo facial con agrandamiento gingival, discapacidad intelectual, hipoplasia o aplasia de las uñas y falanges terminales e hipertrichosis. Otro ejemplo es que mutaciones dañinas de novo en *KCNH1* causantes de la reducción del umbral de activación y una inactivación retardada del canal están presentes en el síndrome de Temple-Baraitser el cual es un trastorno del desarrollo multisistémico caracterizado por discapacidad intelectual, epilepsia e hipoplasia o aplasia de las uñas del pulgar y del primer dedo del pie. La ausencia del canal en ratones no ocasiona problemas en memoria, aprendizaje, comportamiento social y funcionamiento sensoriomotor normales, sin embargo, es causante de hiperactividad leve (Gripp et al., 2001; Simons et al., 2015; Kortüm et al., 2015; Kessi et al., 2020)

Por otra parte, la expresión ectópica de Kv10.1 se ha relacionado cada vez más con la oncogénesis y la progresión tumoral debido a que se ha reportado una relación causal entre la sobreexpresión ectópica del canal Kv10.1 con la carcinogénesis que llega a sobre expresarse en alrededor del 70% de los tumores sólidos. La sobreexpresión de el mismo induce un fenotipo con características de células tumorigénicas. Además, el mRNA y su producto se han detectado en líneas celulares numerosas del cáncer y tumores primarios, es por ello que muchos estudios sobre el canal Kv10.1 y el cáncer lo han propuesto como un marcador tumoral o bien como un objetivo terapéutico en varios tipos de cáncer (Downie, et al., 2008; Ouadid et al., 2016; Camacho, 2006).

## 1.4 Canal dependiente de voltaje Nav1.7

El canal Nav1.7 pertenece a la familia de los canales de sodio dependientes de voltaje, que permiten la entrada de sodio desde el espacio extracelular al citosol después de la despolarización de la membrana (Hille, 2001).

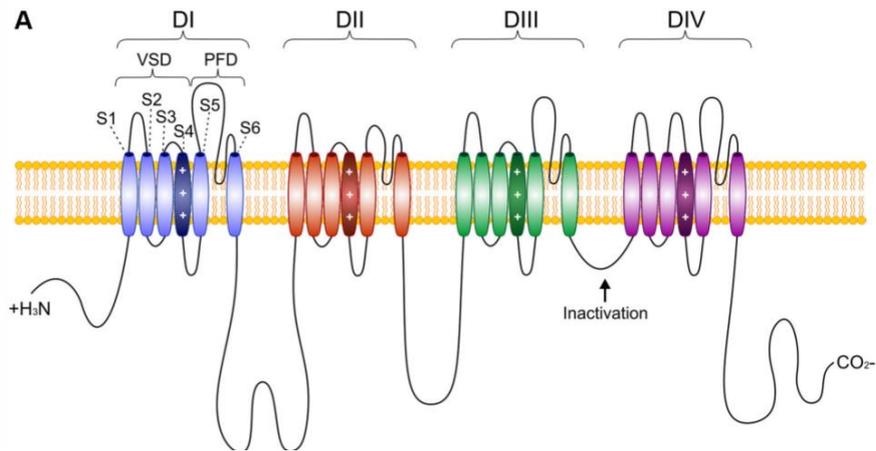
### 1.4.1 Expresión

Nueve miembros de la familia de canales de sodio dependientes de voltaje se encuentran expresados en mamíferos, los cuales van de Nav1.1 a Nav1.9 y las propiedades funcionales de estos canales son relativamente similares. Estas isoformas tienen más del 50% de identidad en la secuencia de aminoácidos en los dominios transmembrana y extracelular. Esto en comparación con los canales de potasio y los canales de calcio en donde todos los miembros de distintas subfamilias son menos del 50% idénticos a los de otras familias (Catterall et al, 2005).

Los transcritos del gen *SCN9A* codifican para el canal Nav1.7, el cual se detectó por primera vez en las neuronas ganglionares somatosensoriales y desde entonces se ha reportado en células de Schwann, neuronas sensoriales olfativas, neuronas sensoriales viscerales y miocitos lisos. Sin embargo, también se ha detectado la expresión de Nav1.7 en células no excitables, incluidas las células tumorales de próstata y mama en donde potencia directamente los procesos integrales de la metástasis (Scholz, 2007; Scholz, 2007; Dib-Hajj et al., 2012).

### 1.4.2 Estructura

La estructura se basa en un polipéptido largo (subunidad  $\alpha$  altamente procesada) que se pliega en cuatro dominios homólogos los cuales van de DI a DIV los cuales están unidos por tres bucles (L1-L3), cada uno con seis segmentos transmembrana (S1-S6). La región de la proteína del S1 al S4 comprende el dominio de detección de voltaje (VSD). El segmento S4 se conoce como el "sensor de voltaje" debido a que presenta residuos de arginina y lisina con carga positiva. Los segmentos S5 y S6 y el asa que los une constituye el dominio de formación de poro (PFD). En esta región hay grandes bucles extracelulares glicosilados los cuales conforman el módulo del poro. Además, la compuerta de inactivación se encuentra en el asa intracelular que une a los dominios DIII y DIV (Scholz, 2007; Bennet et al., 2019; Dib-Hajj et al., 2012) (Figura 4).



**Figura 4.** Representación esquemática de la subunidad  $\alpha$  de los canales Nav1.7. La subunidad  $\alpha$  de los canales Nav1.7 está estructurada en 4 dominios homólogos cada uno constituido por 6 segmentos transmembranales. El segmento S4 de cada dominio presenta aminoácidos cargados positivamente y funciona como el sensor de voltaje del canal, es decir cuando existe un cambio en el potencial de membrana de la célula, el segmento S4 se mueve y provoca un cambio conformacional en la proteína del canal que permite la apertura del poro de conducción (Catterall 2003). Obtenido de Bennett et al., 2019.

#### 1.4.3 Biofísica

El canal Nav1.7 produce corrientes iónicas con una rápida activación e inactivación. Se caracteriza por una lenta recuperación desde de la inactivación y su corriente es bloqueada a concentraciones nanomolares de tetrodotoxina (TTX) perteneciendo así a los canales de sodio sensibles a esta toxina (TTX-S) en comparación con otros miembros de la familia de canales de sodio que requieren de concentraciones micromolares de la toxina para su inhibición como lo son las subunidades Nav1.5, Nav1.8, Nav1.9 y se clasifican como resistentes a la TTX (TTX-R) (Bennett et al., 2019; Dib-Hajj et al., 2012; Mattei, 2018).

#### 1.4.4 Farmacología

Hay dos categorías amplias de moduladores de canal Nav1.7: los bloqueadores de poros que ocluyen físicamente el poro del canal, y los que modulan la dependencia del voltaje de canal. Los bloqueadores de poros tienen siempre efectos inhibidores sobre la actividad del canal, mientras que los modificadores pueden tener tanto efectos activadores como inhibidores. Para Nav1.7 los principales bloqueadores tetrodotoxina, saxitoxina, anestésicos locales, antiepilépticos y antiarrítmicos, mientras que los principales activadores son Veratridina y batracotoxina (Eagles et al., 2020; Catterall et al., 2005).

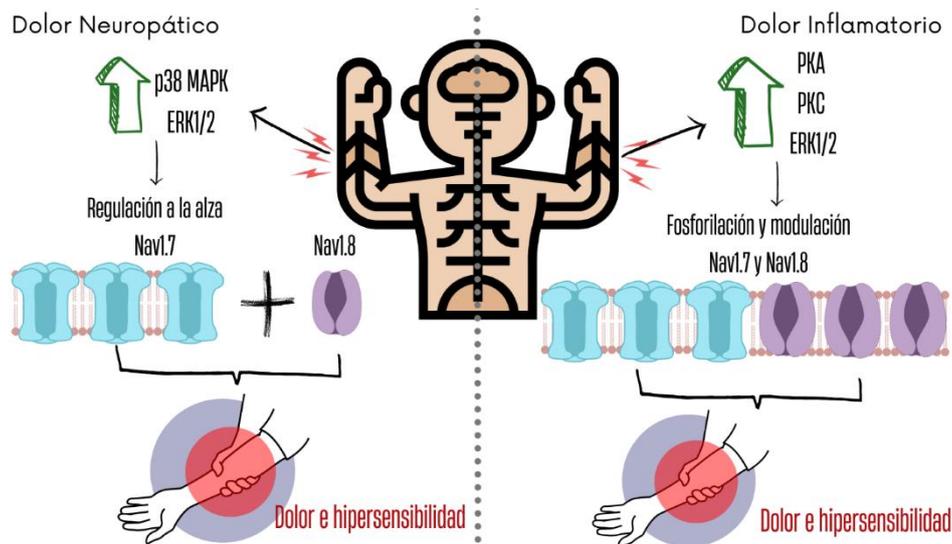
Por otra parte, existen 79 anticuerpos monoclonales aprobados por la FDA como inhibidores de Nav1.7 los cuales ofrecen varios beneficios que incluyen alta selectividad y afinidad, baja toxicidad y larga vida media. Un ejemplo es SVMab1 el cual inhibe potently los canales Nav1.7 con una concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) de 31 nM y proporcionaba analgesia en modelos de ratón con dolor inducido por formalina y dolor neuropático crónico, independientemente de la vía de administración. (Eagles et al., 2020; Liu et al., 2016).

Se ha encontrado que el nivel de expresión de Nav1.7 se asocia significativamente con el tamaño del tumor y la supervivencia de las células tumorales. Sin embargo, la inhibición de Nav1.7 por algunos bloqueadores como PF-05089771 inducen un aumento en el número de células apoptóticas y disminuyen el potencial invasivo de células de cáncer de endometrio (Liu et al., 2019)

#### 1.4.5 Papel de Nav1,7 en la Fisiología y Fisiopatología

La nocicepción es un proceso fisiológico que involucra la activación de la señalización neuronal que es esencial para la percepción del dolor. Si bien la nocicepción es importante para la supervivencia, ya que advierte sobre cualquier estímulo dañino o potencialmente dañino, el dolor patológico no lo es y puede ser extremadamente debilitante si persiste. Se ha demostrado que varios canales iónicos expresados en las neuronas nociceptivas desempeñan un papel en la inducción del dolor, en particular, el canal Nav1.7. Este canal se expresa, preferentemente, en las neuronas nociceptivas de conducción más lenta y en las neuronas simpáticas, estando predominantemente asociado en trastornos de dolor en humanos (Emery et al., 2016; Hameed, 2019).

El mecanismo propuesto del papel de Nav1.7 en la fisiopatología del dolor neuropático (dolor que surge como consecuencia directa de una lesión o enfermedad que afecta el sistema somatosensorial) es que la lesión nerviosa conduce a un mayor número de quinasas como p38 MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos) y ERK1/2 (quinasas reguladas por señales extracelulares). Esto conduce a la modulación de los canales Nav1.7 y Nav1.8 el cual contribuye a una mayor descarga espontánea conducen a dolor espontáneo e hipersensibilidad. Por su parte, en el dolor inflamatorio (se produce como resultado de una lesión tisular relacionada con la inflamación) las células inflamatorias y los mediadores están presentes en mayor número en el sitio de lesión e inflamación del tejido. Esto da como resultado un mayor número de quinasas como lo son PKA (proteína quinasa A), PKC (proteína quinasa C) y p38 MAPK las cuales fosforilan y modulan los canales Nav1.7 y Nav1.8, que están regulados al alza en los nociceptores que inervan el tejido dañado lo cual conduce a un aumento en los potenciales de acción ectópicos lo que da como resultado dolor e hipersensibilidad espontáneos (Figura5) (Hameed, 2019).



**Figura 5.** Participación del canal Nav1.7 en el dolor. El canal Nav1.7 tiene la función de activar las neuronas sensoriales que detectan el dolor para dar orientación y provocar la propagación del estímulo doloroso.

En muchos tipos de cáncer, las células malignas muestran una expresión de complejos Nav. Tanto la expresión de novo como la regulada al alza de Nav se correlacionan directamente con el grado de malignidad. De hecho, en las células cancerosas, los Nav participan en la migración celular, la invasividad y la metástasis tumoral. (Banderali et al., 2023). Para el caso de Nav1.7 este tiene una expresión muy alta en numerosos tipos diferentes de cáncer y, como en el caso de otros Nav, sus niveles de expresión se correlacionan directamente con un comportamiento maligno, un mal pronóstico y una baja supervivencia del paciente. Por medio de experimentos de Western blot se ha encontrado en varias líneas celulares de cáncer humano altos niveles de expresión de Nav1.7 en SKOV3 (cáncer de ovario) y dos líneas celulares de glioblastoma, U87MG y U87MGvIII, así como en líneas celulares de cáncer de páncreas humano Capan-1, Bxpc3, Mia-Paca2 y Panc1. Por su parte se ha reportado niveles moderados de expresión de Nav1.7 en LN18 (glioblastoma), DU-145 (cáncer de próstata) y Jurkat (leucemia). (Banderali et al., 2023)

#### 1.4.6 Canalopatías

Nav1.7 ganó especial atención como un objetivo putativo del dolor después del descubrimiento de que las mutaciones en *SCN9A*, el gen que codifica para el canal Nav1.7, subyace a la condición de Insensibilidad Congénita al Dolor, en donde además de la falta de nocicepción, estos pacientes presentan anosmia parcial como único deterioro sensorial adicional. El examen detallado de pacientes con esta condición reveló inteligencia normal, reflejos tendinosos, función autonómica, reacción intradérmica de histamina, así como sentidos táctil, térmico y vibratorio normales, sin embargo, la ausencia de un comportamiento nocifensivo conduce a una acumulación de lesiones indoloras, mordeduras, contusiones, fracturas óseas y una reducción de la esperanza de vida (Vetter et al., 2017).

Por otro lado, mutaciones de ganancia de función en las cuales se modifica la activación de Nav1.7 a potenciales más negativos, que a su vez conduce a hiperexcitabilidad causan enfermedades como la eritromelalgia primaria del síndrome de dolor neuropático crónico. Esta se caracteriza por ataques dolorosos insoportables en las extremidades que comienzan en la niñez y progresan a lo largo de la vida, lo que conlleva a que las actividades cotidianas puedan ser factores desencadenantes de dolor, como estar de pie durante mucho tiempo, un ligero aumento de la temperatura ambiente, hacer ejercicio o usar ropa abrigada (Lampert et al., 2010).

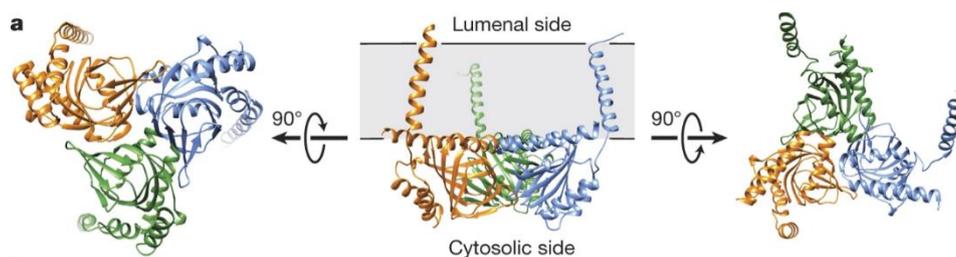
Así mismo, la expresión de canales de sodio dependientes de voltaje se ha asociado con la motilidad celular y el comportamiento metastásico, es así como investigaciones previas han demostrado que las concentraciones de Na<sup>+</sup> son notablemente más altas en los tumores que en los tejidos normales, y que este fenómeno está íntimamente relacionado con la tumorigénesis. (Xia et al., 2016) En particular se ha observado que Nav1.7, se expresa ectópicamente en ciertos tipos de cáncer y juegan un papel en el desarrollo de cáncer, un ejemplo es el cáncer gástrico, en el que juega un papel esencial en el mantenimiento del microambiente tumoral intracelular alcalino y extracelular ácido, promoviendo la progresión del cáncer a través de la regulación positiva del intercambiador de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> tipo 1 (NHE-1). El intercambiador NHE-1 juega un papel esencial en la regulación del pH del microambiente tumoral, alcalinizando el citoplasma y acidificando el espacio extracelular mediante la importación de Na<sup>+</sup> y la exportación de H<sup>+</sup> en una proporción de 1:1 (Xia et al., 2016; Litan et al., 2015).

Los canales de sodio Nav1.7 son de gran interés biomédico para el desarrollo de nuevas terapias. No obstante, no es una tarea fácil, ya que la clave para el desarrollo de inhibidores seguros del canal Nav1.7 es la selectividad de los compuestos propuestos a dicho canal. La expresión de los canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje, se limita principalmente a las neuronas y a las células musculares. Aquí controlan numerosas funciones corporales esenciales incluyendo la cognición, la entrada sensorial, la función autónoma, el ritmo cardíaco, y el control muscular, siendo así, sumamente importante que los métodos de analgesia realmente sean bloqueadores selectivos de Nav1.7, ya que de lo contrario se estarían perjudicando rutas importantes de la fisiología humana (Medina et al., 2022).

Debido a que las investigaciones demuestran que la actividad del canal Kv10.1 y Nav1.7 es partícipe de múltiples procesos relevantes en la carcinogénesis, afectando los *hallmarks* del cáncer y dando lugar a la progresión de la enfermedad. Es de vital importancia médica indagar en nuevas formas de modular su actividad para así encontrar nuevas dianas terapéuticas para enfermedades como el cáncer.

## 1.5 El receptor Sigma-1

Sigma-1 (Sig1R) es una proteína de 25-kDa que funciona como “chaperona” molecular la cual reside principalmente en la membrana del retículo endoplásmico con capacidad de translocación a la membrana plasmática, aunque también es posible encontrarla en la mitocondria y núcleo (Hanner et al., 1996). El análisis de cristalografía de rayos X del receptor Sig1R reveló una estructura trimérica, en la que cada receptor del trímero tiene un solo dominio transmembrana que lo ancla al lado citosólico del retículo endoplásmico y está conformado de una cadena polipeptídica de 223 aminoácidos (Figura 6) (Liu et al., 2017; Chu et al., 2015)



**Figura 6.** Estructura tridimensional de Sig1R. El receptor muestra una estructura triangular que comprende tres protómeros estrechamente asociados, cada uno con un solo dominio transmembrana. Obtenido de Schmidt et al., 2016.

Los receptores sigma-1 se encuentran particularmente concentrados en la membrana del retículo endoplásmico asociada a las mitocondrias. En situaciones de estrés celular, es decir, cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular aumenta, los receptores sigma-1 se activan y trasladan a otras áreas de la célula. Esto permite su interacción con diversas proteínas de membrana. Una vez que los receptores sigma-1 interactúan con sus proteínas asociadas, actúan como una subunidad reguladora y tienen un impacto en la regulación de los procesos de neurotransmisión. Por lo anterior los ligandos sigma-1 han sido propuestos como herramientas terapéuticas para tratar diversas patologías de origen nervioso, incluyendo la depresión y la ansiedad, los trastornos en la memoria y el aprendizaje, y el dolor (Hayashi & Su, 2007; Sánchez-Fernández et al., 2017).

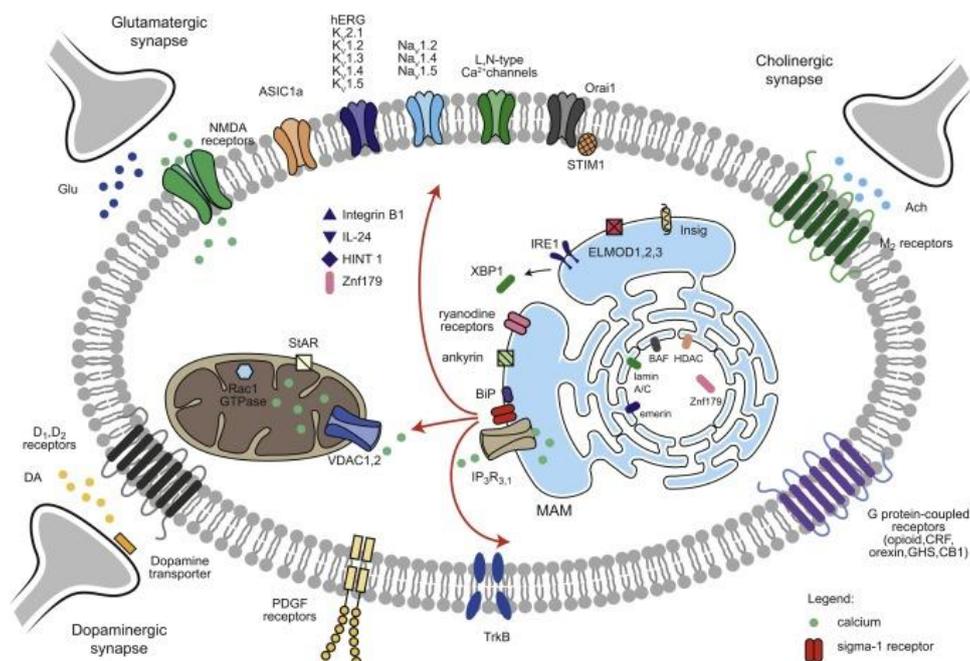
Si bien el receptor Sig1R se ha estudiado principalmente por sus funciones dentro del sistema nervioso, se ha relacionado también con muchos estados de enfermedad y condiciones diversas. El receptor Sig1R se ha identificado en una amplia variedad de tumores humanos que se originan en tejidos neuronales pero también en aquellos no neuronales, un ejemplo de ello es su expresión en células de melanoma, cáncer de colon y adenocarcinoma de mama humano (Brimson et al., 2020). Evidencias sugieren que los agonistas del receptor Sig1R presentan efectos positivos en el tratamiento de afecciones mentales, como la depresión, el Alzheimer y la adicción a las drogas (Schmidt et al., 2016). Por el contrario, los antagonistas del receptor Sig1R pueden usarse en el diagnóstico y tratamiento

de muchos cánceres; además también tienen propiedades analgésicas (Brimson et al., 2020; Schmidt et al., 2016; Maurice et al., 2009).

El receptor Sig1R se ha convertido en uno de los nuevos y más prometedores objetivos farmacológicos en el dolor y otras patologías. Los transcritos y proteína del receptor Sig1R se expresan en altos niveles de control del dolor tanto en el sistema nervioso central como en el periférico. El receptor Sig1R interactúa físicamente con los receptores de opioides restringiendo su funcionamiento, por lo que la inhibición de Sig1R mejora la analgesia y puede aumentar los efectos antihiperalgésicos de los péptidos opioides endógenos, producidos naturalmente por las células inmunitarias, que se acumulan en el sitio inflamado para aliviar el dolor inflamatorio (Bravo, et al., 2019; Ruiz, et al., 2020).

Se ha demostrado que el receptor Sig1R también se encuentra sobre expresado y participa en la biología de la carcinogénesis en una variedad de tumores, aunque su gen *SIGMAR1* no es considerado un oncogén. Las evidencias sugieren que el gen *SIGMAR1* está regulado positivamente en varios tipos de cáncer, incluidos aquellos originados en pulmón, mama, esófago, páncreas, próstata e hígado, así como en glioblastoma. En células homólogas normales provenientes de los mismos tejidos el gen *SIGMAR1* se ha identificado expresado en niveles bajos (Kim et al., 2017). Por otra parte, se ha encontrado un aumento de Sig1R en células cancerosas de alto potencial metastásico, lo que puede sugerir un vínculo entre su expresión y la agresividad (Borde et al., 2023). Esto ha dado como resultado que numerosos estudios preclínicos estén evaluado la utilidad de los fármacos específicos para Sig1R marcados radiactivamente como agentes de formación de imágenes tumorales junto con técnicas como la tomografía por emisión de positrones o la tomografía computarizada por emisión de fotón único (Kim et al., 2017; Borde et al., 2023; Robinson et al., 2023).

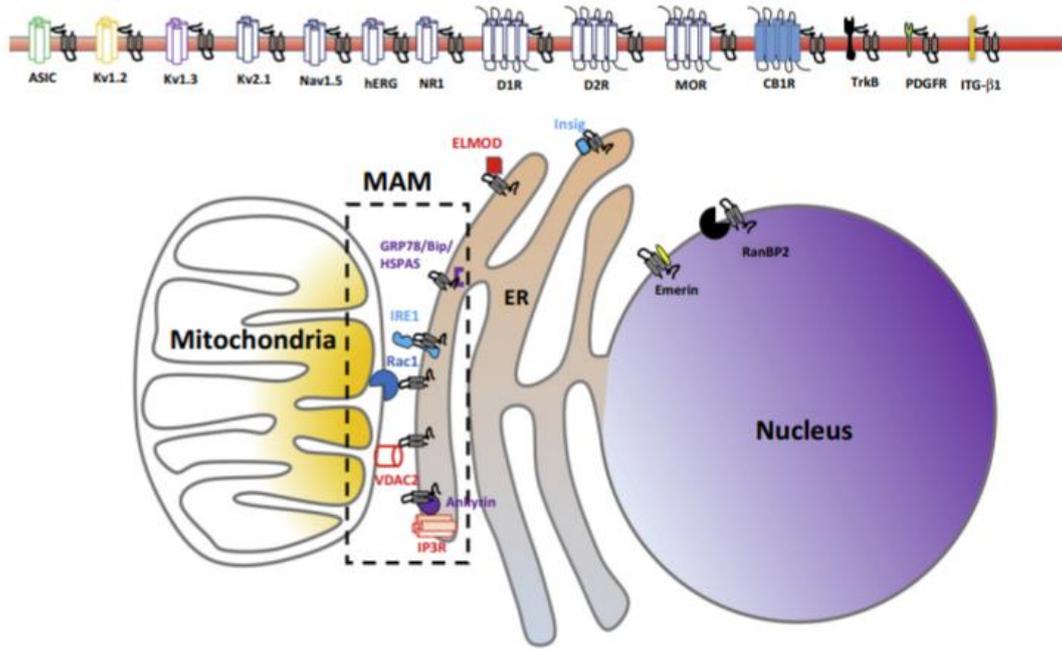
Los receptores Sig1R interactúan con canales iónicos, receptores acoplados a proteína G (GPCR) y moléculas de señalización celular (Figura 7). Por tanto, no sorprende que el receptor participe en diversos procesos fisiológicos y farmacológicos. Además, el receptor Sig1R regula la compartimentación de los lípidos en el retículo endoplásmico y su posterior transporte a la membrana plasmática y el citosol (Salaciak et al., 2022).



**Figura 7.** Interacción de los receptores Sig1R. El receptor Sig1R se transloca en varios compartimentos celulares, interactuando con canales iónicos, receptores acoplados a proteína G, proteínas plasmáticas, proteínas mitocondriales y proteínas nucleares. Obtenido de Salaciak et al., 2022.

### 1.5.1 Modulación de canales iónicos por Sig1R

Sig1R es capaz de interactuar con una gran variedad de canales iónicos modulando así su actividad (Figura 8). Además, se ha demostrado que esta modulación en algunos casos resulta potenciada por agonistas de esta chaperona e inhibida con la aplicación de antagonistas de Sig1R, aunque los mecanismos de acción no se conocen completamente. Se ha demostrado que la interacción de Sig1R con canales  $K_v1.2$ , aumenta su expresión superficial. También inhibe los canales  $K_v1.3$ ,  $K_v1.4$  y  $K_v1.5$ , regula los canales  $K_v2.1$ , inhibe el voltaje de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L y N, inhibe los canales de iones de sodio dependientes de voltaje:  $Na_v1.2/Na_v1.4$  y  $Na_v1.5$  y regula los canales hERG (Salaciak et al., 2022; Morales-Lázaro et al., 2019). Además, los receptores Sig1R inhiben los canales iónicos sensibles al ácido (ASIC1a) activando una proteína G sensible a PTX y estimulando la calcineurina unida a AKAP150. (Morales-Lázaro et al., 2019) También inhiben el  $Ca^{2+}$  al disminuir el acoplamiento de la molécula de interacción estromal 1 con la proteína 1 del canal de calcio activada por liberación de calcio (Morales-Lázaro et al., 2019; Abraham et al., 2019; Aydar et al., 2002; Kinoshita et al., 2021; Zhang et al., 2005; Church et al., 1995; Gao et al., 2012; Johannessen et al., 2009; Balasuriya et al., 2014; Carnally et al., 2010; Srivats et al., 2016).



**Figura 8.** Proteínas que interactúan con el receptor Sig1R. Obtenido de Su et al., 2016.

<b>CANAL IÓNICO</b>	<b>EFEECTO</b>
<i>K<sub>v</sub>1.2</i>	Incremento en la expresión del canal con la estimulación de Sig1R
<i>K<sub>v</sub>1.3</i>	Expresión de Sig1R incrementó la inactivación del canal
<i>K<sub>v</sub>1.4</i>	Incremento en la inactivación del canal de forma dosis dependiente con la sobreexpresión de Sig1R
<i>K<sub>v</sub>1.5</i>	Inhibición de las corrientes con la estimulación y sobreexpresión de Sig1R
<i>K<sub>v</sub>2.1</i>	
<i>Canales de Ca<sup>2+</sup> tipo-L</i>	Inhibición del canal con agonistas de Sig1R
<i>Canales de Ca<sup>2+</sup> tipo-N</i>	Sobreexpresión o estimulación de Sig1R inhibieron al canal
<i>Nav1.5</i>	Inhibición de la expresión del canal
<i>ASIC1A</i>	Disminución de la corriente por la estimulación de Sig1R
<i>HERG</i>	Sobreexpresión de Sig1R potenció al canal
<i>STIM1/ORAI1</i>	

<i>Canales del retículo endoplásmico</i>	<i>del</i> InsP <sub>3</sub> R <sub>1</sub>	Disminución de la liberación de Ca <sup>2+</sup> por agonistas de Sig1R
	InsP <sub>3</sub> R <sub>3</sub>	Incremento en la liberación de Ca <sup>2+</sup> mediante la sobreexpresión o activación de Sig1R

**Tabla 1.** Principales interacciones de Sig1R con canales iónicos. Modificada de Ryskamp et al., 2019.

### 1.5.2 Farmacología del Sig1R

Se han clasificado los compuestos como agonistas del receptor Sig1R si inducen efectos mediados por el receptor Sig1R en estudios con animales o se asemejan a los fenotipos de sobreexpresión del receptor, como una mayor translocación de los receptores Sig1R a la membrana plasmática, interacción con varias proteínas, neuroprotección, pero también aumento de la proliferación de células cancerosas. Por el contrario, los antagonistas de Sig1R son compuestos que no ejercen efectos farmacológicos por sí mismos, sino que suprimen los efectos de la activación de los receptores o imitan el fenotipo de la su desactivación. Este efecto resulta de cómo los ligandos del receptor Sig1R afectan el proceso de oligomerización: los antagonistas promueven los oligómeros de alto orden, mientras que los agonistas, los monómeros y los dímeros (Tabla 2) (Salaciak et al., 2022).

<b>AGONISTA</b>	<b>ANTAGONISTA</b>
Fluvoxamine	NE-100
Igmesine	Haloperidol
Pregnenolone-S	Sertraline
DHEA-S	BD1047
Donepezil	BD1063
PPBP	
SA4503	
PRE-048	
(+)SKF10047	

**Tabla 2.** Agonistas y Antagonistas de Sig1R. Obtenido de Ishikawa, et al., 2010

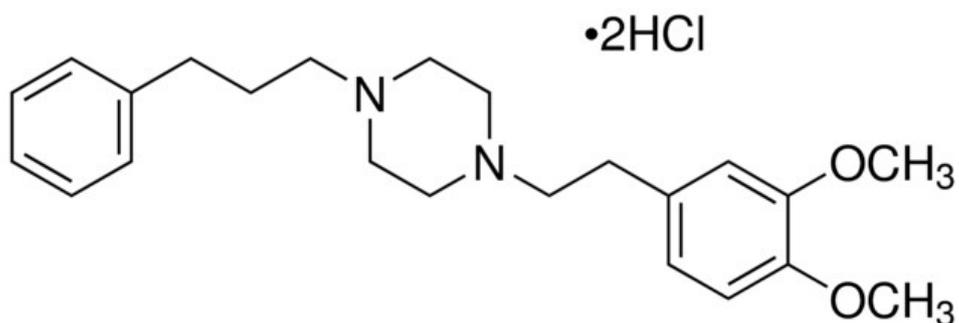
Otro mecanismo de regulación del receptor Sig1R es por medio de la interacción con la chaperona BiP (proteína de unión a inmunoglobulina). El receptor Sig1R que forma un complejo con BiP está en un estado latente, mientras que el receptor Sig1R que se disocia de BiP ejerce una actividad de chaperona máxima. La asociación entre los receptores Sig1R y BiP es dependiente de  $Ca^{2+}$  y, por lo tanto, el agotamiento de  $Ca^{2+}$  en el retículo endoplásmico activa la chaperona del receptor Sig1R. Es importante destacar que, incluso en presencia de  $Ca^{2+}$ , los agonistas del receptor Sig1R provocan la disociación de BiP de los receptores Sig1R, lo que lleva a la activación de las chaperonas del receptor Sig1R. Algunos de los antagonistas del receptor Sig1R inhiben la acción de sus agonistas. Por lo tanto, los fármacos sintéticos que pueden asociarse con los receptores Sig1R activan o inhiben la actividad chaperona del receptor Sig1R (Ishikawa, et al., 2010; Hayashi, T. 2015).

Además, no podemos asumir que todos los agonistas potenciales del receptor Sig1R estabilizan solo la estructura monomérica y los antagonistas a los oligómeros de alto peso molecular. Por lo tanto, los datos estructurales actuales son insuficientes para diferenciar la actividad intrínseca de los ligandos del receptor Sig1R. Lo que vale la pena mencionar es que los agonistas y antagonistas afectan la estabilidad de los multímeros de los receptores Sig1R, disminuyendo o aumentando el número de multímeros del receptor, respectivamente (Salaciak et al., 2022).

## 1.6 Compuesto SA4503

La Cutamesina o SA4503 (1-(3,4-Dimethoxyphenethyl)-4-(3-phenylpropyl)piperazine dihydrochloride) (Figura 9) es un agonista del receptor Sig1R potente y selectivo, exhibiendo una afinidad 100 veces menor para el subtipo de receptor sigma 2 y poca o ninguna afinidad hacia otros 36 receptores, canales iónicos y sistemas de segundo mensajero (Senda et al., 1996).

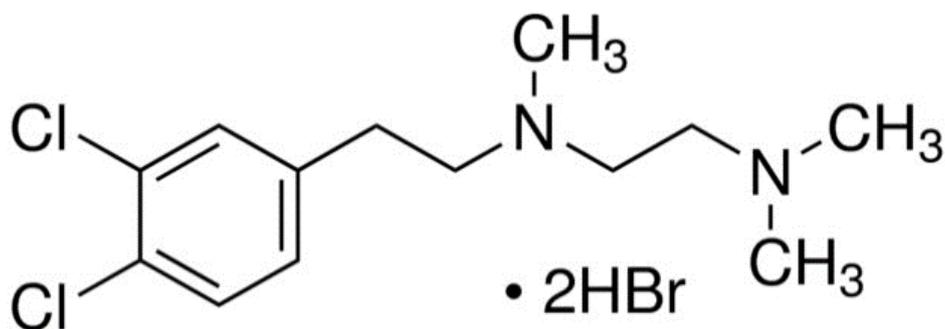
Hasta la fecha, solo SA4503 (cutamesina) ha completado los ensayos clínicos de fase II para el trastorno depresivo mayor. Además, el compuesto también se probó para la seguridad y la restauración de la función motora en pacientes después de un accidente cerebrovascular isquémico agudo (Ishikawa, et al., 2010).



**Figura 9.** Estructura molecular de SA4503. Obtenido de Merck, 2022.

### 1.7 Compuesto BD1047

El BD1047 (Figura 10) es un antagonista selectivo del receptor Sig1R que se utiliza en la investigación del receptor sigma para ayudar a diferenciar y caracterizar la función y el papel del receptor Sig1R versus otros subtipos del receptor sigma. BD1047 también se ha utilizado para ayudar a definir el papel de Sig1R en los procesos neurológicos (Roh et al., 2014)



**Figura 10.** Estructura molecular BD1047. Obtenido de Merk, 2022.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La expresión enriquecida del canal Kv10.1 en células cancerosas, su expresión limitada en otros tejidos y su localización en membrana hacen de Kv10.1 una proteína prometedora en la investigación del cáncer, convirtiéndose en un marcador tumoral potencial o en una diana de fármacos contra el cáncer, con especial interés en la investigación sobre los mecanismos que regulan su expresión. Así mismo se ha descrito que el canal Nav1.7 desempeña un papel crucial en el desarrollo y progresión del cáncer, lo que no ha convertido en el foco de investigación, además, Nav1.7 (Luis et al.,2022; Liu et al., 2019; Pérez et al., 2017).

Por lo anterior, los canales iónicos como blancos para el tratamiento de enfermedades son cada vez más recurridos y desde el descubrimiento del receptor Sig1R esta se ha convertido en una interesante diana farmacológica, debido a que, entre sus diversas funciones destaca como una de sus características más intrigantes la capacidad de regular la función y el tráfico de una gran variedad de proteínas membranales. Se ha descubierto que Sig1R regula canales iónicos, entre ellos los activados por voltaje como lo son canales de K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup>. Esta función reguladora le da una poderosa capacidad de regular lo que parece favorecer la supervivencia celular en contextos patológicos. Es así como la utilización de moduladores de Sig1R en donde se encuentran los agonistas como el SA4503 (cuya interacción ha sido investigada en amplios estudios clínicos) y los antagonistas como el BD1047 (utilizado para la eliminación de la percepción anormal del dolor en modelos de cáncer de hueso) ha sido ampliamente recurrida para el estudio de diversas patologías (Soriani, et al., 2019).

En esta tesis se explora la modulación que tiene la chaperona Sig1R en los canales iónicos Nav1.7 y Kv10.1, buscando los efectos que tienen antagonistas y agonistas sobre la electrofisiología, invasión y viabilidad de células que expresan estos canales.

### 3. HIPÓTESIS

La modulación farmacológica de la chaperona Sigma-1 es capaz de regular la función de los canales iónicos Kv10.1 y Nav1.7.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de SA4503 y BD1047, moduladores de la chaperona Sigma-1 sobre las corrientes mediadas por los canales Nav1.7 y Kv10.1, la capacidad invasiva y viabilidad de células HEK-293 con expresión de estos canales.

### 4.2 Objetivos particulares

- Identificar la presencia de la chaperona Sigma-1 en la línea celular HEK-293 a través de ensayos de inmunofluorescencia.
- Estudiar mediante ensayos electrofisiológicos de *patch-clamp* el efecto del agonista y antagonista de Sigma-1, SA4503 y BD1047, sobre la biofísica de los canales Nav1.7 y Kv10.1 tales como: densidad de corriente, conductancias y  $V_{1/2}$  de activación; a las 24 y 48 horas de tratamiento.
- Evaluar el efecto de SA4503 y BD1047 sobre la migración, capacidad invasiva y viabilidad en células HEK-293 con expresión del canal Nav1.7 y Kv10.1 después de 24 horas de tratamiento.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Cultivos celulares:

Las líneas celulares utilizadas a lo largo de los experimentos fueron las líneas celulares HEK-293 (Human Embryonic Kidney, por sus siglas en inglés) silvestres o WildType (HEK-WT; CRL-1573, ATCC), HEK-293 las cuales expresan de forma estable el canal humano de potasio  $K_v10.1$  (HEK- $K_v10.1$ ; donadas amablemente por los Drs. Walter Stühmer y Luis A. Pardo del Max-Planck-Institute of Experimental Medicine, Göttingen) y células HEK-293 con expresión transitoria del canal humano de sodio  $Nav1.7$  (HEK- $Nav1.7$ ; 60507, BPS Bioscience) las cuales fueron sembradas en placas de cultivo de 24 pozos para su crecimiento. Las células HEK-WT y HEK- $K_v10.1$  se mantuvieron en medio de cultivo DMEM (11965092, Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (261400087, Gibco), 1% de penicilina/estreptomocina (15140122, Gibco), las células HEK- $K_v10.1$  adicionalmente tenían zeocina como antibiótico de selección (30  $\mu\text{g/ml}$ , R25001, Invitrogen). Las células HEK- $Nav1.7$  se mantuvieron para su crecimiento en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomocina, 10  $\mu\text{g/ml}$  de blasticidina (R210-01, Gibco) y 200  $\mu\text{g/ml}$  de zeocina; 24 horas antes de los experimentos, el medio de crecimiento fue cambiado por un medio para la expresión de los canales iónicos de sodio, el cual está compuesto de DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 10  $\mu\text{g/ml}$  de doxiciclina (sc-337691, Santa Cruz Biotechnology) y 3 mM de butirato de sodio (sc-202341B, Santa Cruz Biotechnology). Las células se incubaron a 37 °C y 5% de  $\text{CO}_2$ . Después de 18 a 24 horas de sembradas, las células se levantaron a través de medios enzimáticos y mecánicos, para lo cual a los pozos de cultivo se les retiró el medio y se les añadió tripsina (sc-391060, Santa Cruz Biotechnology) durante 1 minuto, posteriormente se les agregó medio de cultivo completo y se disgregaron las células adheridas con una pipeta de cultivo (disociación mecánica), las células en suspensión se centrifugaron durante 5 minutos a 300 rcf, después el sobrenadante es retirado, y fueron preparadas para los distintos experimentos con tratamientos de SA4503 y BD1047 a distintas concentraciones.

### 5.2 Electrofisiología

Una vez despegadas las células fueron depositadas en cubreobjetos control, SA4503 y BD1047 a 50  $\mu\text{M}$  para HEK- $K_v10.1$  y a 25  $\mu\text{M}$  para HEK- $Nav1.7$ . Posteriormente los cristales con las células se colocaron en una cámara de registros, manteniendo a las células siempre en solución extracelular (Tabla 5 y 6). Las corrientes iónicas generadas por las células HEK- $K_v10.1$  y HEK- $Nav1.7$  fueron estudiadas mediante la técnica de *patch-clamp* en el modo de fijación de voltaje en la configuración de célula completa, dichos experimentos fueron realizados a temperatura ambiente.

Reactivos	Solución intracelular [mM]	Solución extracelular [mM]
KCl	140	5.4
NaCl	-	140
MgCl <sub>2</sub>	1	1.2
EGTA	10	-
HEPES	10	10
Glucosa	-	10
CaCl <sub>2</sub>	-	1.8
pH	7.2*	7.4**
Osmolaridad	300 mOsm	300 mOsm

\*ajustado con KOH; \*\* ajustado con NaOH

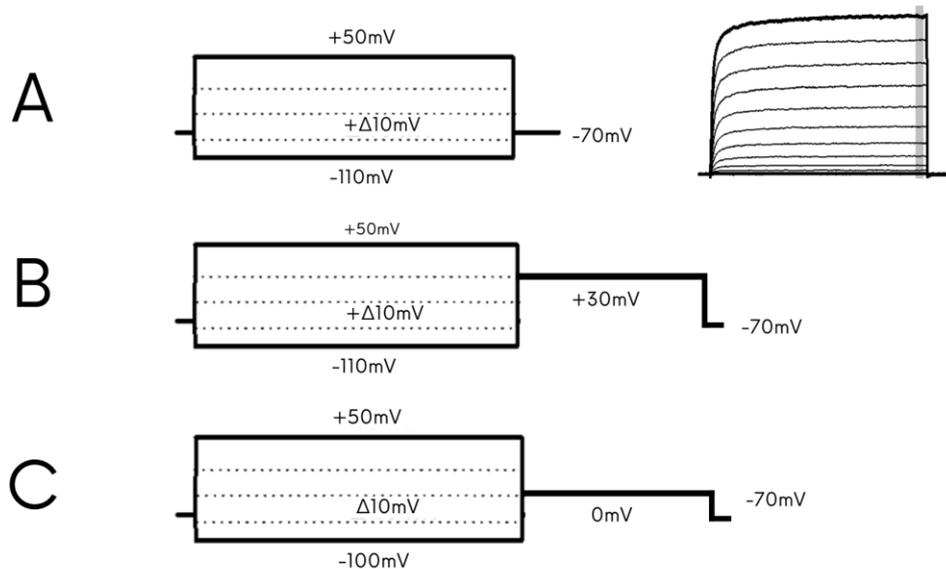
**Tabla 3.** Soluciones para registros electrofisiológicos HEK-K<sub>v</sub>10.1

Reactivos	Solución intracelular [mM]	Solución extracelular [mM]
KCl	40	5
NaCl	10	140
MgCl <sub>2</sub>	3	1.2
EGTA	5	-
HEPES	10	10
Glucosa	10	10
Gluconato de K <sup>+</sup>	95	-
CaCl <sub>2</sub>	-	1.8
pH	7.4*	7.4*
Osmolaridad	300 mOsm	300 mOsm

\*ajustado con KOH; \*\* ajustado con NaOH

**Tabla 4.** Soluciones para registros electrofisiológicos HEK-Nav1.7

Para construir las gráficas de corriente contra voltaje de las células HEK-  $K_v10.1$  (I-V), el potencial de membrana de las células se fijó a  $-70$  mV, desde este voltaje las corrientes fueron activadas con pulsos de voltaje de  $-100$  a  $+50$  mV en pasos de  $10$  mV, los cuales tenían  $250$  ms de duración (Figura 11A izquierda), en este protocolo se midió la amplitud de la corriente (Figura 11A derecha). Para el proceso de inactivación dependiente de voltaje se usó un protocolo de doble pulso, en el cual se aplicaban pulsos de prueba de  $-110$  a  $+50$  mV en pasos de  $20$  mV durante  $1.5$  ms seguido de un pulso fijo a  $+30$  mV (Figura 11B). En el caso de las células Nav1.7 para la construcción de las gráficas I-V, el potencial de membrana de las células se fijó a  $-70$  mV, desde ese voltaje las corrientes se activaron con pulsos que fueron desde  $-100$  a  $+50$  mV con una duración de  $100$  ms seguidos de un pulso fijo a  $0$  mV durante  $30$  ms (Figura 11C).



**Figura 11.** Protocolos experimentos electrofisiología. A) A la izquierda protocolo de pasos de voltaje para construir curvas I-V de HEK- $K_v10.1$ , iniciando en  $-110$  mV y terminando en  $+50$  mV con deltas de  $10$  mV; a la derecha ejemplo de corrientes HEK- $K_v10.1$ , en sombreado las regiones usadas para cuantificar la amplitud de la corriente. B) Protocolo de doble pulso para células HEK- $K_v10.1$  en donde se inicia de  $-110$  mV a  $+50$  mV en deltas de  $10$  mV seguido de un pulso que se mantiene fijo a  $+30$  mV. C) Protocolo de doble pulso para el estudio de HEK-Nav1.7, inicia de  $-100$  mV a  $+50$  mV en deltas de  $10$  mV seguido de un pulso fijo a  $0$  mV. Todos los protocolos fueron hechos con un voltaje de mantenimiento de  $-70$  mV.

Las corrientes se registraron con un amplificador Multiclamp 700B (Molecular Devices), a una velocidad de muestreo de  $10$  kHz y un filtro pasabajos de  $2$  kHz. La resistencia en serie fue compensada al  $40\%$ . Los datos se digitalizaron usando el conversor analógico-digital Axon Digidata 1550 (Molecular Devices). El control de los estímulos y la adquisición de datos se realizó con el programa pClamp 10 (Molecular Devices). En los experimentos se utilizaron pipetas con

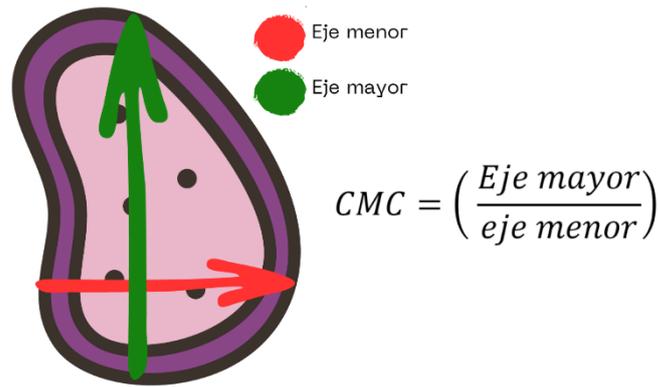
una resistencia de 2-5 M $\Omega$  fabricadas con capilares de vidrio de borosilicato (Kwik-Fil, WPI, USA).

### 5.3 Ensayo de viabilidad.

La viabilidad celular se cuantificó a través de la medición simultánea de la fluorescencia, para el caso de HEK-Nav1.7 (Debido a que expresa la proteína GFP), la fluorescencia fue emitida por las moléculas calceína-AM de color rojo-anaranjado (577/590 nm) (C34851, Invitrogen) y DAPI (341/452 nm) (112002, Cell Biolabs), por su parte para HEK-Kv10.1 y HEK-WT se utilizó calceína-AM de color verde (517/494 nm) (ENZ-52002, Enzo Life Sciences) y yoduro de propidio de color rojo (535/617 nm) (ENZ-52403, Enzo Life Sciences).

Las células se sembraron a una concentración de 5,000 células por pozo en placas de cultivo de 24 pozos (3524, Costar) y se incubaron a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Transcurrida las 24 horas, el medio de cada pozo fue sustituido por medio completo fresco adicionado con cada una de las moléculas a ensayar (SA4503 y BD1047) a 25  $\mu$ M y 10  $\mu$ M para HEK-Nav1.7 y a 50  $\mu$ M y 25  $\mu$ M para el caso de HEK- Kv10.1 y HEK-WT, posteriormente se incubaron durante 24 horas. Transcurrido dicho tiempo, el medio de cada pozo fue sustituido PBS (solución amortiguadora de fosfato con pH 7.4, por sus siglas en inglés) que contenía las moléculas fluorescentes correspondientes para cada línea celular a 1  $\mu$ M; las células en estas condiciones fueron incubadas durante 15 min. Transcurrido este tiempo las placas de cultivo con las células fueron colocadas en el equipo ImageXpress Micro XLS (Molecular Devices), el cual es un microscopio de epifluorescencia invertido automatizado. Las células vivas para el caso de HEK- Kv10.1 y HEK-WT fueron aquellas que mostraban señal fluorescente para calceína-Verde y las células muertas aquellas que mostraban señal para Ioduro de propidio (Rojo), mientras que para las células HEK- Nav1.7, las células vivas mostraban señal fluorescente para calceína-Roja y las células muertas mostraban señal para DAPI (Azul). 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%. Las fotografías capturadas fueron analizadas por el procesador de imágenes FIJI.

Así mismo se realizó un análisis morfológico a 24 horas. Para ello, se midió el cociente indicativo de la morfología celular (CMC) en donde se tomó como eje mayor a la longitud mayor de la célula y el eje menor. (Fig. 12)



**Figura 12.** Cálculo de la morfología celular.

#### 5.4 Ensayo de Invasividad

Todas las líneas celulares fueron evaluadas en un experimento de invasividad, en el cual las células previamente suspendidas en medio completo con 0.5% de suero fetal bovino y al cual se le añadió cada compuesto a 25  $\mu\text{M}$  para HEK-Nav1.7 y a 50  $\mu\text{M}$  para HEK- Kv10.1 y HEK-WT para posteriormente ser plantadas a una densidad de 15,000 células por pozo en insertos con membranas de PET en formato para 24 pocillos las cuales son tratadas por la parte inferior de su superficie con matrigel durante 40 minutos, como se muestra en la figura 13, por la parte de abajo de la canastilla se utilizó medio completo con 10% de suero fetal bovino como quimioatrayente. Transcurridas 24 horas de cultivo se limpió la parte superior de la membrana y se añadió al medio calceína-AM de color verde (517/494 nm) para marcar membranas de las líneas HEK-WT y HEK-Kv10.1 y Hoescht para marcar núcleos (392/440 nm), para el caso de HEK-Nav1.7 no se añadió Calceína-Verde y en su lugar se ocupó el gen reportero GFP que fluoresce en Verde. Se capturan las imágenes correspondientes por la parte inferior de la membrana para contabilizar el número de células que pudieron atravesarla. Todas las imágenes fueron adquiridas en el equipo ImageXpress Micro XLS (Molecular Devices) usando un objetivo de 10x.



**Figura 13.** Ensayo de Viabilidad. Representación gráfica del ensayo de viabilidad en donde se explica la

disposición de los elementos utilizados, en azul se muestra el medio con bajo porcentaje de suero fetal bovino y en rojo el quimioatrayente con mayor cantidad de suero fetal bovino. Modificado de Pijuan et al., 2019.

## 5.5 Inmunofluorescencia

Las células HEK-WT fueron sembradas en cubreobjetos tratados con laminina (1 µg/mL) durante 30 min y con poli-L-lisina durante 15 min, esto para favorecer su adhesión. Una vez sembradas las células se mantienen en cultivo durante 72hrs. Transcurrido este tiempo se comienza con el protocolo, como primer paso se hace un doble lavado con PBS a 4 °C para continuar con la adición de la sonda lipofílica FMTM 4-64 FX, después de 5 min se hace un segundo doble lavado con PBS para poder hacer la fijación con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos en los cuales las muestras se dejan en constante agitación en hielo, una vez pasados los 30 minutos se continúa con un tercer doble lavado con PBS para realizar después una permeabilización con Tritón X-100 0.1% en hielo y agitación constante después de 10 min se prosigue a realizar el bloqueo con BSA 5% durante 3 H con agitación constante a temperatura ambiente, se les adicionó a las células después de las 3 H 700 µL de anticuerpo primario monoclonal de ratón sigma receptor B-5 (SC-137075) (1:200) y se dejó incubar durante toda la noche, posteriormente se remueve el anticuerpo primario y se hace un cuarto doble lavado con PBS, para continuar con la adición del anticuerpo secundario Alexa488 alfa mouse (1:200) durante 30 minutos, se retira el anticuerpo secundario y se realiza un último doble lavado con PBS. Se realiza el montaje de los cubreobjetos con Fluoroshield con DAPI y se deja secar durante 24 H protegido de la luz. Las imágenes se adquirieron gracias a un microscopio confocal Zeiss LSM 800 y con una magnificación de 60x. Las imágenes fueron analizadas con el software Fiji.

## 5.6 Moléculas.

Todos los compuestos fueron almacenados a -20°C en stocks disueltos en agua y a una concentración de 50 o 100 mM. Para los experimentos electrofisiológicos los compuestos se disolvieron a la concentración deseada en solución extracelular normal de registro.

BD1047 (B8562, Sigma Aldrich); SA4503 (SML2181, Sigma Aldrich); Tritón X-100 (X100-100ML, Sigma-Aldrich)

## 5.7 Análisis

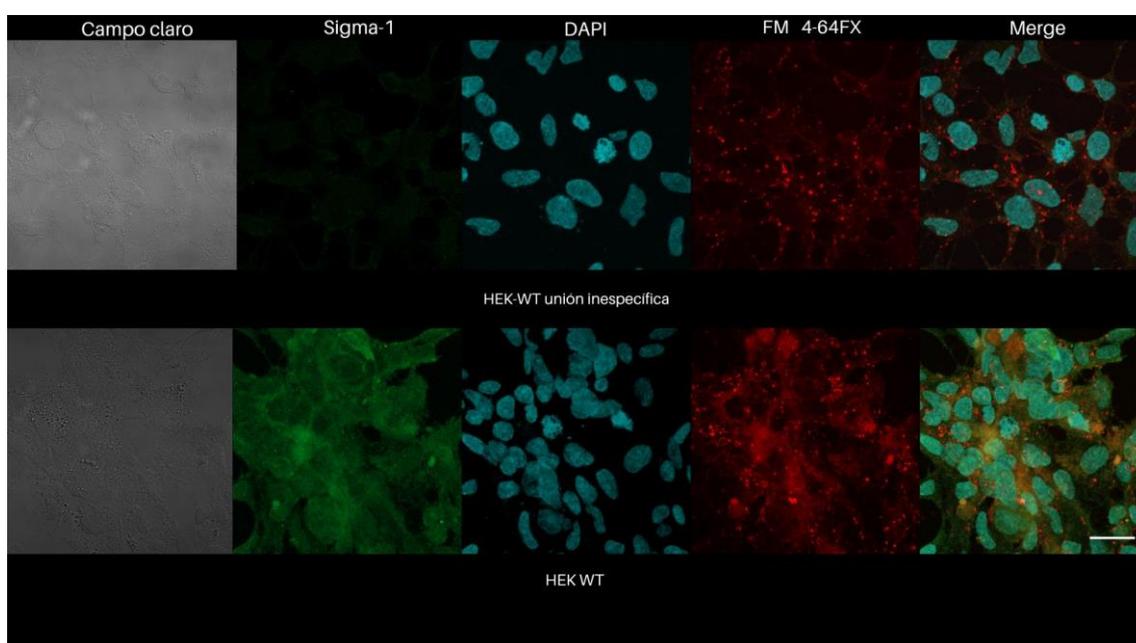
Los resultados fueron graficados y analizados usando el paquete de software Origin 2016. Los análisis estadísticos se analizaron usando Graph Prisma 9.0, para la comparación de estudios no pareados se utilizaron pruebas de *t* de Student; para el análisis de los ensayos funcionales se utilizaron pruebas ANOVA de una vía con post hoc de Dunnet. El efecto fue estadísticamente significativo cuando se obtuvo un valor de  $P < 0.05$ . En lo que respecta a las imágenes de Microscopía, se analizaron, procesaron y extrajeron los datos con

Fiji: ImageJ versión 1.53. Los datos se presentan en promedios con error estándar.

## 6.RESULTADOS

### 6.1 La chaperona Sig1R se expresa en células HEK WT

Ortíz-Rentería y colaboradores en 2018 determinaron a partir de microscopía confocal si Sig1R se encontraba presente en células HEK293. Exploramos la expresión del receptor Sig1R mediante experimentos de inmunodetección y microscopía de epifluorescencia usando el anticuerpo primario sigma receptor B-5 el cual se une a la fracción F5 del receptor Sig1R y anticuerpo secundario Alexa488 alfa mouse en células HEK293 (WT). Los resultados indican la presencia de Sig1R en células HEK293 (Fig. 14).



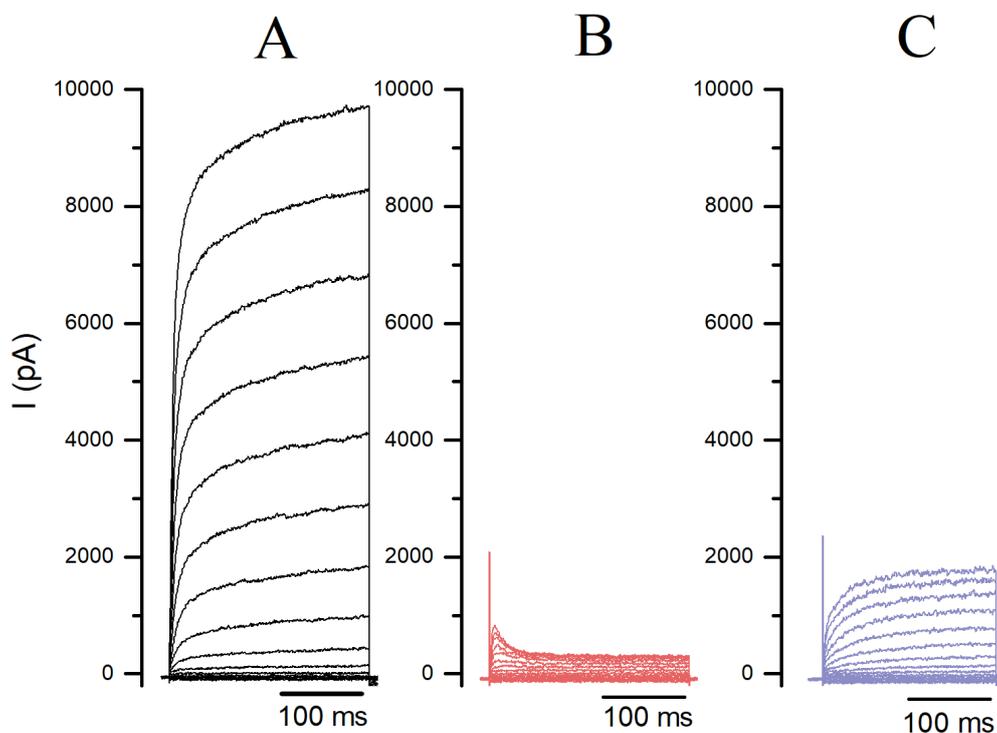
**Figura 14.** Imágenes de inmunofluorescencia de células HEK-WT en las cuales se observa la fotografía en microscopía de campo claro, Sig1R fracción F5 acoplado a Alexa488 (verde), núcleos teñidos con DAPI (azul), membrana celular teñida con FMTM 4-64 X (rojo), y la fusión de estas. La barra blanca representa 20 micrometros.

### 6.2 Modulación farmacológica del receptor Sig1R y su efecto sobre el canal Kv10.1

Los experimentos se encaminaron a caracterizar el efecto de la modulación de la chaperona Sig1R por las moléculas SA4503 (agonista) y BD1047 (antagonista) sobre las corrientes generadas por el canal Kv10.1. Las células HEK con expresión estable del canal humano Kv10.1 (HEK- Kv10.1) generan corrientes iónicas con características electrofisiológicas similares a las descritas en la literatura en preparaciones nativas (así como en trabajos previos en el laboratorio) para este canal, con corrientes que incrementaban su amplitud conforme el potencial de membrana se despolarizaba y no muestran inactivación durante la aplicación de los pulsos de voltaje (Fig. 15A).

### 6.2.1 Efecto de SA4503 y BD1047 tras 24 H de incubación sobre las corrientes generadas por el canal $K_v10.1$

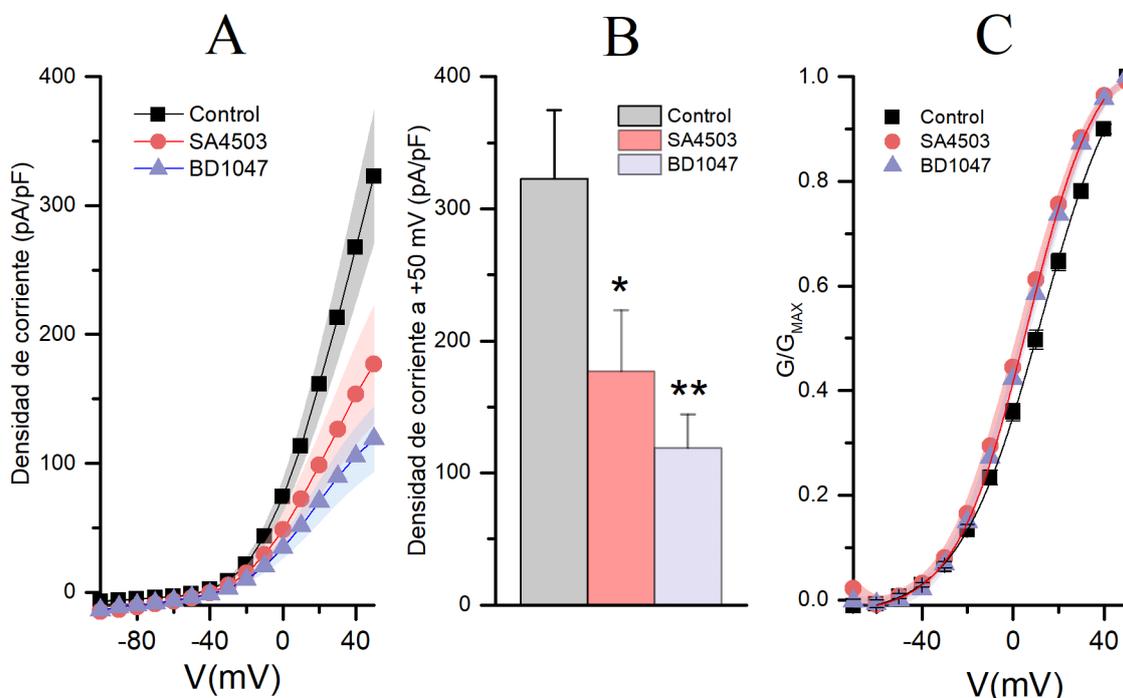
Después de 24 H incubadas con las diferentes moléculas de estudio



**Figura 15. Efecto de SA4503 Y BD1047 sobre las corrientes  $K_v10.1$  a las 24 H postratamiento.** A) Registro representativo de las corrientes iónicas registradas en células HEK-  $K_v10.1$  en la situación control. B) Registro representativo del efecto del compuesto SA4503 sobre las corrientes iónicas generadas por el canal  $K_v10.1$ . C) Registro representativo del efecto del compuesto BD1047 sobre las corrientes iónicas generadas por el canal  $K_v10.1$ .

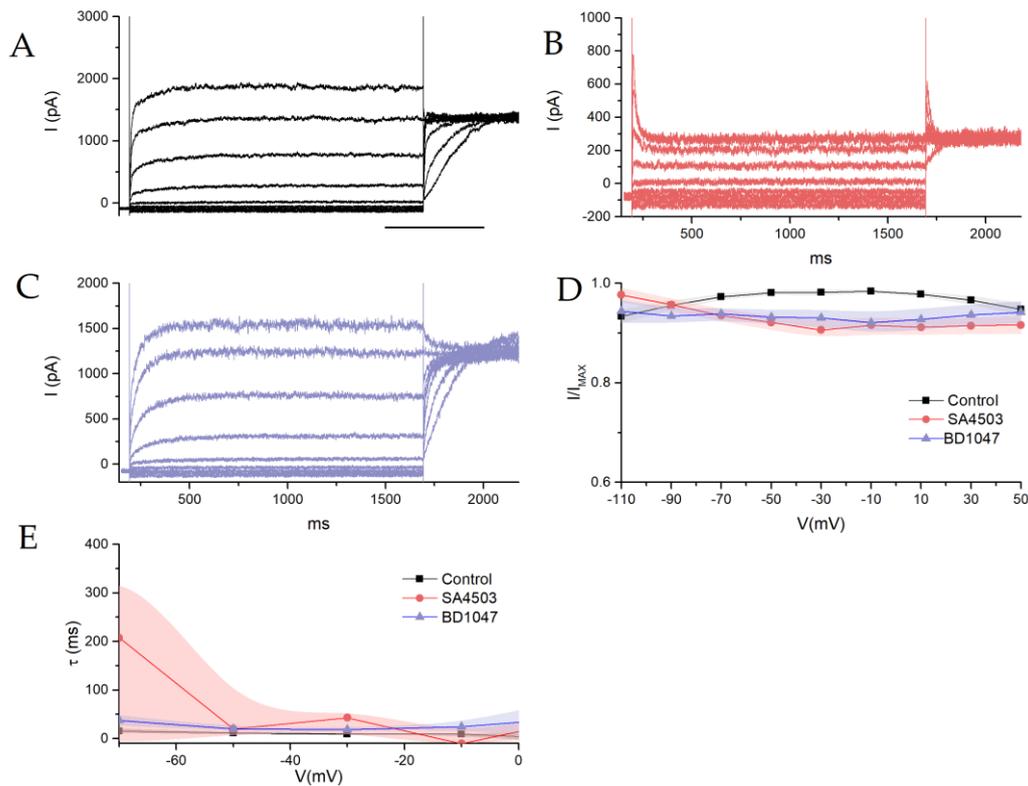
Para poder comparar la amplitud de las corrientes en las tres situaciones experimentales se procedió a obtener la densidad de corriente ( $pA/pF$ ), lo cual consiste en normalizar la corriente de cada célula entre su tamaño celular, estimado a través del valor de la capacitancia de la célula ( $C_m$ ). Al comparar estas tres condiciones (Fig. 16A) podemos observar que las densidades de corriente medidas a  $+50$  mV de las células con tratamiento disminuyen con respecto al control, siendo el compuesto BD1047 el que provoca disminución de aproximadamente el 63.2% y el SA4503 provoca una disminución de aproximadamente 45.1%. Al realizar el análisis estadístico (Fig. 16B) se observa que SA4503 y el BD1047 produjeron una disminución significativa de la corriente con respecto al control.

Con los datos obtenidos de la familia de corrientes, se realizó el análisis de conductancia. En presencia de SA4503 Y BD1047 se observó que el  $V_{1/2}$  de activación se desplazó ligeramente hacia valores más negativos de  $12.5 \pm 0.8$  mV en control (n = 15) a  $3.7 \pm 0.8$  mV en presencia de SA4503 (n = 13) y a  $6.2 \pm 0.7$  mV en presencia de BD1047 (n = 11) (Fig. 16, C).



**Figura 16. Efecto de SA4503 Y BD1047 sobre el canal  $K_v10.1$  a las 24 H postratamiento.** A) Gráficas de la densidad de corriente contra voltaje del  $K_v10.1$  con el efecto de SA4503 y BD1047. Las corrientes se encuentran normalizadas con respecto a la capacitancia de cada célula. B) Efecto de SA4503 y BD1047 sobre las corrientes de  $K_v10.1$ . \* para una  $P < 0.05$  y \*\* para una  $P < 0.01$ . C) Gráficas de conductancia normalizada ( $G/G_{MAX}$ ), en la condición control y en presencia de SA4503 y BD1047. Los datos experimentales fueron ajustados con la ecuación de Boltzmann (línea sólida).

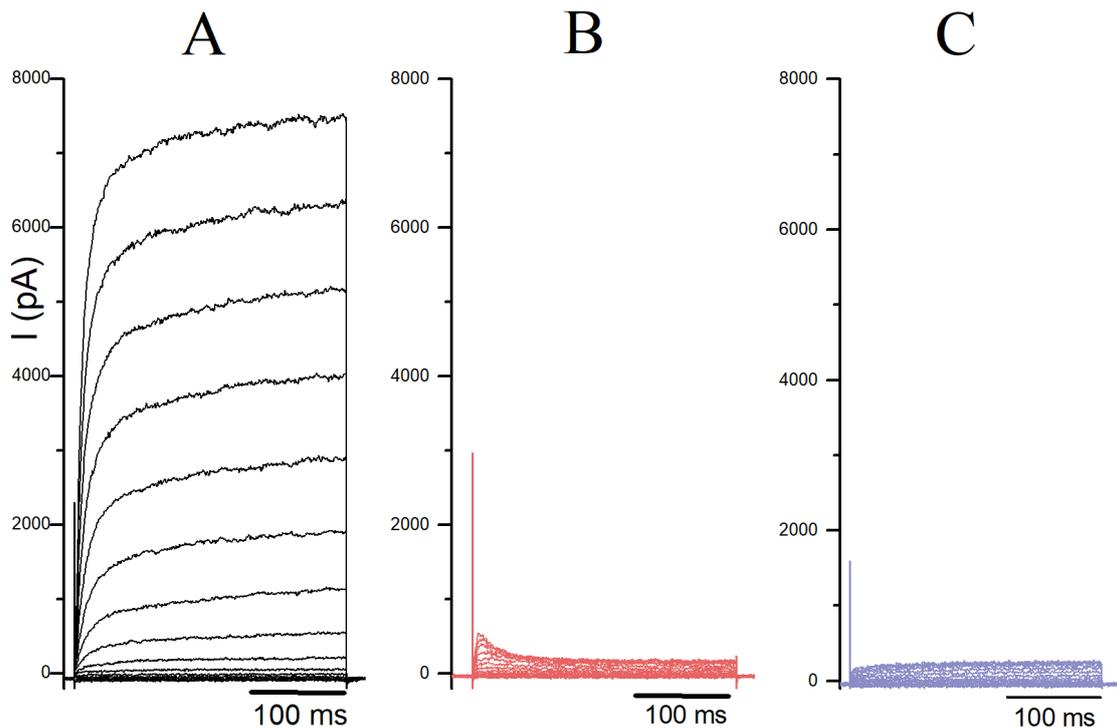
El canal  $K_v10.1$  es un canal que prácticamente no presenta inactivación dependiente de voltaje, no obstante, el SA4503 parece modificar este parámetro (Fig. 17A-C). Para estudiar esto se usó un protocolo de doble pulso el cual consistió en una serie de prepulsos despolarizantes, desde -110 mV a +50 mV (1 s de duración) en incrementos de 20 mV, seguidos cada uno de ellos por un pulso de prueba a +30 mV (0.5 s duración). Al realizar el análisis de la corriente en el pulso de prueba se encontró que la normalización de la corriente  $I/I_{max}$  (Fig. 17D) no presentaba cambios en presencia de algún compuesto con respecto al control. Adicionalmente, se realizó un análisis para saber si existían cambios en la activación del canal, ajustando una exponencial sencilla en la parte inicial de las corrientes, y se obtuvieron las constantes de tiempo de activación (Tau) de las 3 condiciones (Fig. 17E) y en donde tampoco se encontraron diferencias en ninguna de las condiciones con respecto al control.



**Figura 17. Efecto de SA4503 Y BD1047 sobre las corrientes  $K_V10.1$  a las 24 H postratamiento.** A) Registro representativo de las corrientes iónicas registradas en células control en un protocolo de doble pulso. B) Registro representativo del efecto del compuesto SA4503 sobre las corrientes iónicas generadas por el canal  $K_V10.1$  en un protocolo de doble pulso. C) Registro representativo del efecto del compuesto BD1047 sobre las corrientes iónicas generadas por el canal  $K_V10.1$  en un protocolo de doble pulso. D) Gráfica de  $I/I_{MAX}$  de  $K_V10.1$  con el efecto de SA4503 y BD1047. E) Gráfica Tau de  $K_V10.1$  con el efecto de SA4503 y BD1047.

### 6.2.2 Efecto de SA4503 Y BD1047 después de 48 H sobre las corrientes generadas por el canal $K_V10.1$

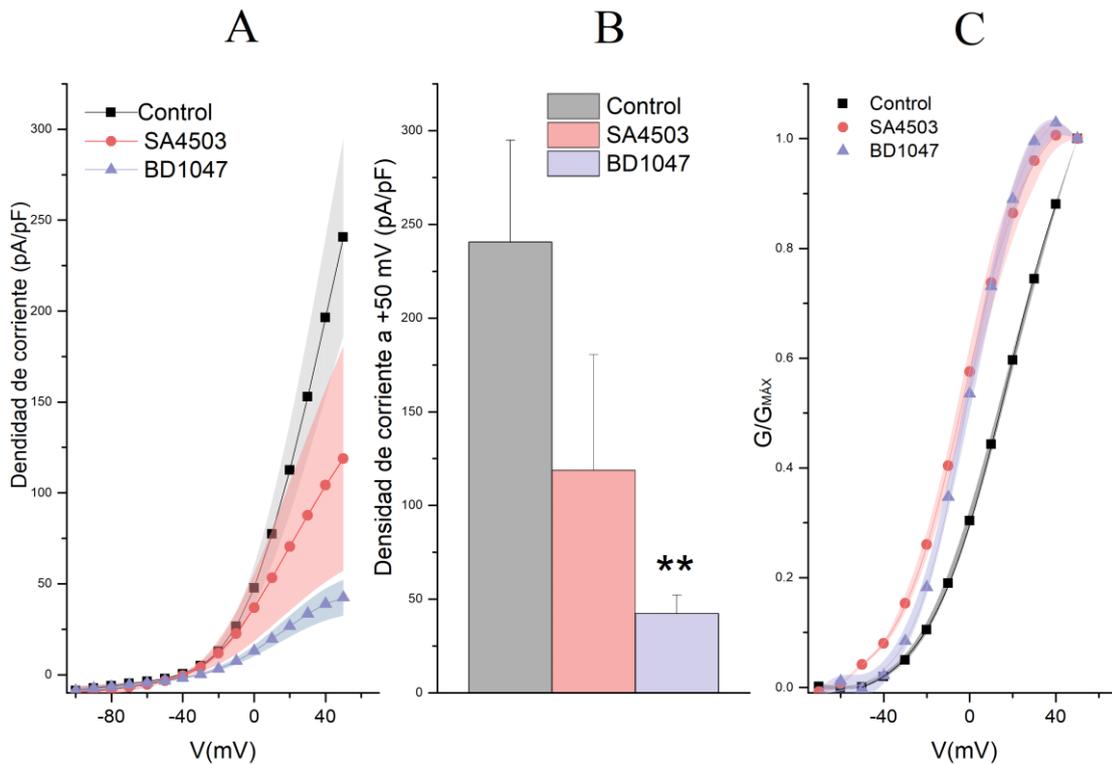
Adicionalmente, se ensayó el efecto de ambos fármacos a las 48 H (Fig. 18A-C); al igual que las 24h, se observó sobre la amplitud de las corrientes, sin embargo, este efecto aparenta ser aún mayor ya que las corrientes iónicas generadas fueron de menor amplitud que las registradas a las 24 h.



**Figura 18. Efecto de SA4503 Y BD1047 sobre las corrientes  $K_v10.1$  a las 48 H postratamiento.** A) Registro representativo de las corrientes iónicas registradas en células control. B) Registro representativo del efecto del compuesto SA4503 sobre las corrientes iónicas generadas por el canal  $K_v10.1$ . C) Registro representativo del efecto del compuesto BD1047 sobre las corrientes iónicas generadas por el canal  $K_v10.1$ .

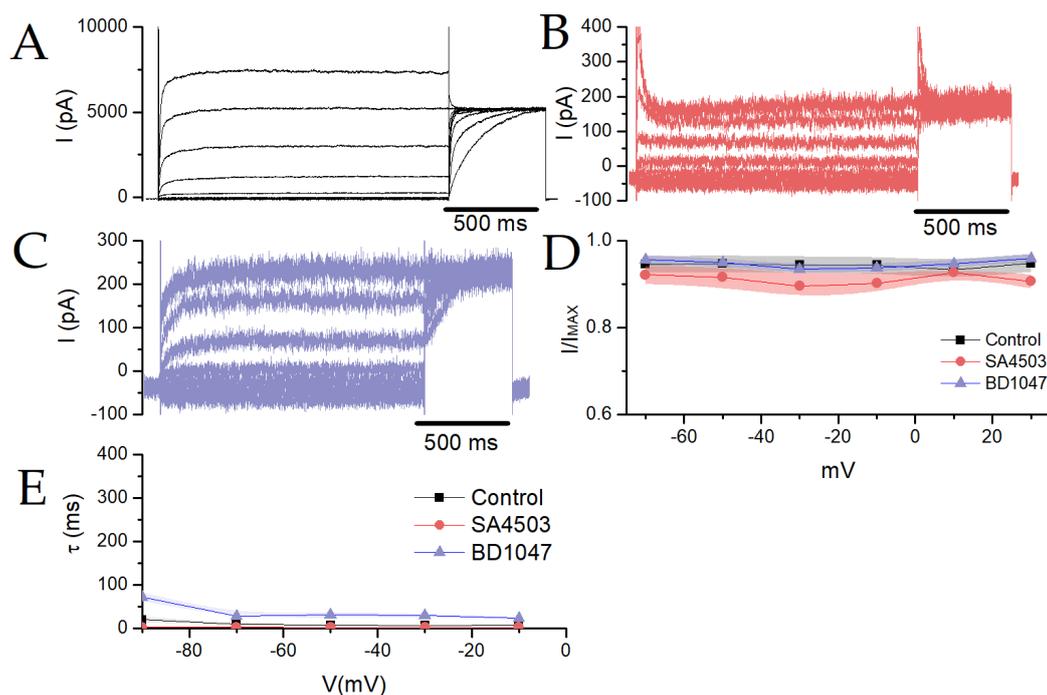
Al obtener la densidad de corriente y comparar las tres condiciones (a un voltaje de +50 mV) (Fig. 19) podemos observar que el compuesto BD1047 provoca una disminución de aproximadamente el 82.4% y el compuesto SA4503 provoca aproximadamente una disminución del 50.6%. Haciendo la comparación de las densidades de corriente (Fig. 19B) únicamente, el compuesto BD1047 produjo una disminución significativa de la corriente con respecto al control ( $P = 0.008$ ; prueba t-Student no pareada).

Con los datos obtenidos de la familia de corrientes, se realizó el análisis de conductancia. En presencia de SA4503 Y BD1047 se observó que el  $V_{1/2}$  de activación se desplazó de mayor manera hacia valores más negativos de  $17.0 \pm 0.8$  mV ( $n = 16$ ) en control a  $-2.6 \pm 0.3$  mV ( $n = 7$ ) en presencia de SA4503 y de  $-0.5 \pm 0.7$  mV ( $n = 10$ ) en presencia de BD1047 (Fig. 19C).



**Figura 19. Efecto de SA4503 Y BD1047 sobre el canal  $K_v10.1$  a las 48 H postratamiento.** En A) gráficas de la densidad de corriente de  $K_v10.1$  con el efecto de SA4503 y BD1047. Las corrientes se encuentran normalizadas con respecto a la capacitancia de cada célula. En B) efecto de SA4503 y BD1047 sobre las corrientes de  $K_v10.1$ . \*\* para una  $P < 0.01$ . En C) gráficas de conductancia normalizada ( $G/G_{MAX}$ ), en la situación control y en presencia de SA4503 y BD1047. Los datos en control y con SA4503 y BD1047 fueron ajustados con la ecuación de Boltzmann (líneas solidas).

Como se menciona anteriormente para estudiar la inactivación dependiente de voltaje se usó un protocolo de doble pulso. Al realizar el análisis de la corriente en el pulso de prueba se encontró que la normalización de la corriente  $I/I_{MAX}$  (Fig. 20D) no se observaron cambios en presencia de algún compuesto con respecto al control. Igualmente, se realizó un análisis para saber si existían cambios en la activación del canal, ajustando una exponencial sencilla en la parte inicial de las corrientes, y se obtuvo la Tau de activación de las 3 condiciones (Fig. 20E) en donde tampoco se encontraron diferencias en ninguna de las condiciones con respecto al control.



**Figura 20. Efecto de SA4503 Y BD1047 sobre las corrientes  $K_v10.1$  a las 48 H postratamiento.**

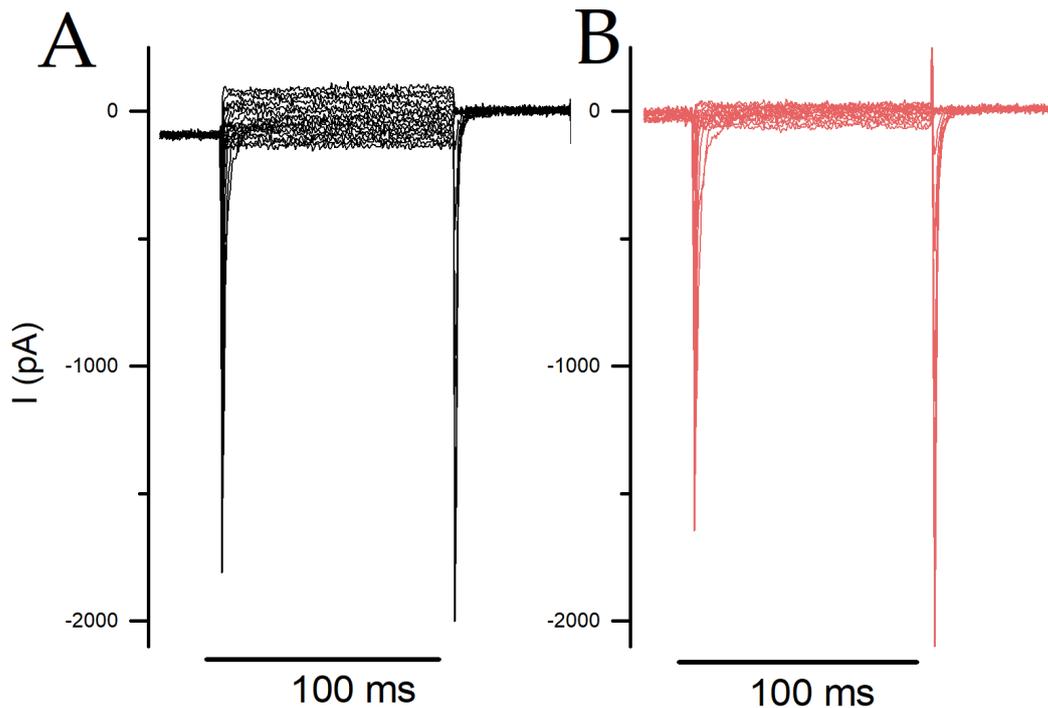
A) Registro representativo de las corrientes iónicas registradas en células control en un protocolo de doble pulso. B) Registro representativo del efecto compuesto SA4503 sobre las corrientes iónicas generadas por el canal  $K_v10.1$  en un protocolo de doble pulso. C) Registro representativo del efecto del compuesto BD1047 sobre las corrientes iónicas generadas por el canal  $K_v10.1$  en un protocolo de doble pulso. D) Gráfica de  $I/I_{MAX}$  de  $K_v10.1$  con el efecto de SA4503 y BD1047. E) Gráfica Tau de  $K_v10.1$  con el efecto de SA4503 y BD1047.

### 6.3 Modulación farmacológica del receptor Sig1R y su efecto sobre el canal $Nav1.7$

Al igual que con el canal de potasio  $K_v10.1$  estos experimentos se enfocaron en el estudio del efecto de la modulación de la chaperona Sig1R por las moléculas SA4503 sobre las corrientes generadas por el canal  $Nav1.7$ . Los registros electrofisiológicos muestran que las células HEK- $Nav1.7$  generan corrientes iónicas con características similares a las descritas en la literatura para el canal  $Nav1.7$ , siendo corrientes entrantes con una activación e inactivación rápida y un voltaje de reversión cercano a +50 mV (Fig. 21A).

#### 6.3.1 Efecto de SA4503 después de 24 H sobre las corrientes generadas por el canal $Nav1.7$

Ya que el compuesto BD1047 parece comprometer la membrana celular en las células HEK con expresión transitoria del canal humano  $Nav1.7$  (HEK- $Nav1.7$ ) no se pudo hacer un estudio sobre esta molécula. En presencia de SA4503 (Fig. 21B) la corriente no parece tener cambios respecto a la condición control.

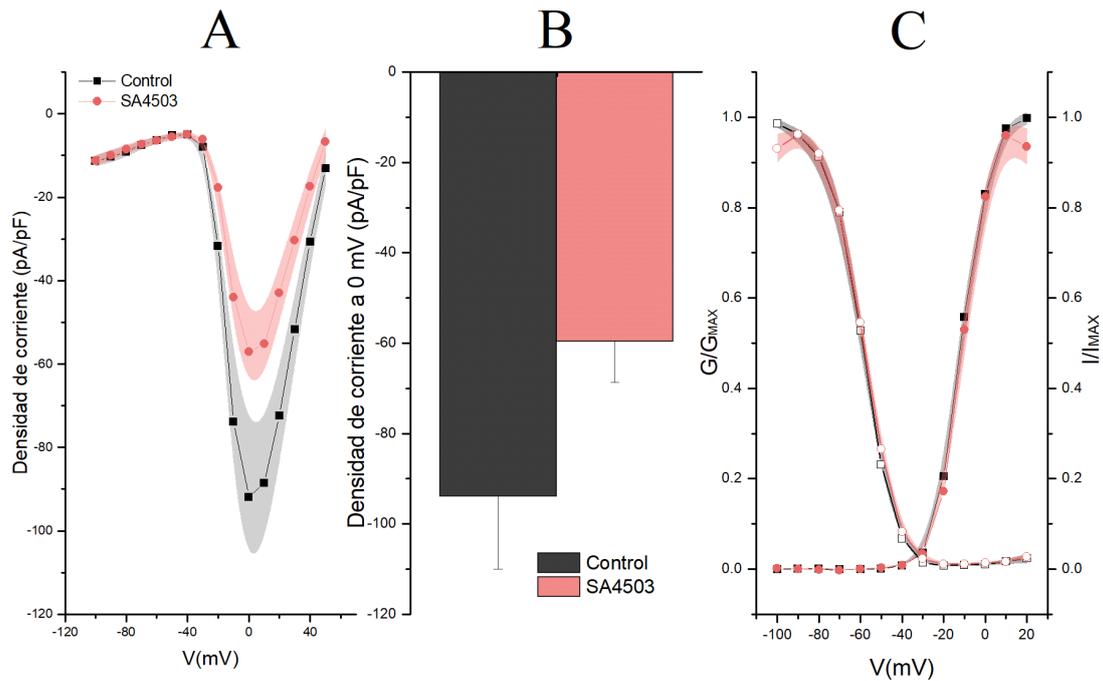


21.

**Figura 21. Efecto de SA4503 sobre las corrientes Nav1.7 a las 24 H postratamiento.** A) Registro representativo de las corrientes iónicas registradas en células control. B) Registro representativo del efecto del compuesto SA4503 sobre las corrientes iónicas generadas por el canal Nav1.7.

Al igual que con el canal Kv10.1 para poder comparar la amplitud de las corrientes en las situaciones experimentales se procedió a obtener la densidad de corriente (pA/pF). Al comparar las condiciones (Fig. 22A) no encontramos cambios estadísticamente significativos para la condición experimental con respecto a la situación control. ( $P > 0.05$ ; prueba t-Student no pareada). Con los datos obtenidos de la familia de corrientes, se realizó el análisis de conductancia. En presencia de SA4503 se observó que el  $V_{1/2}$  de activación se desplazó ligeramente hacia valores más positivos de  $-11.1 \pm 0.76$  mV ( $n = 11$ ) en control a  $-10.5 \pm 2.2$  mV ( $n = 11$ ) en presencia de SA4503 (Fig. 22B).

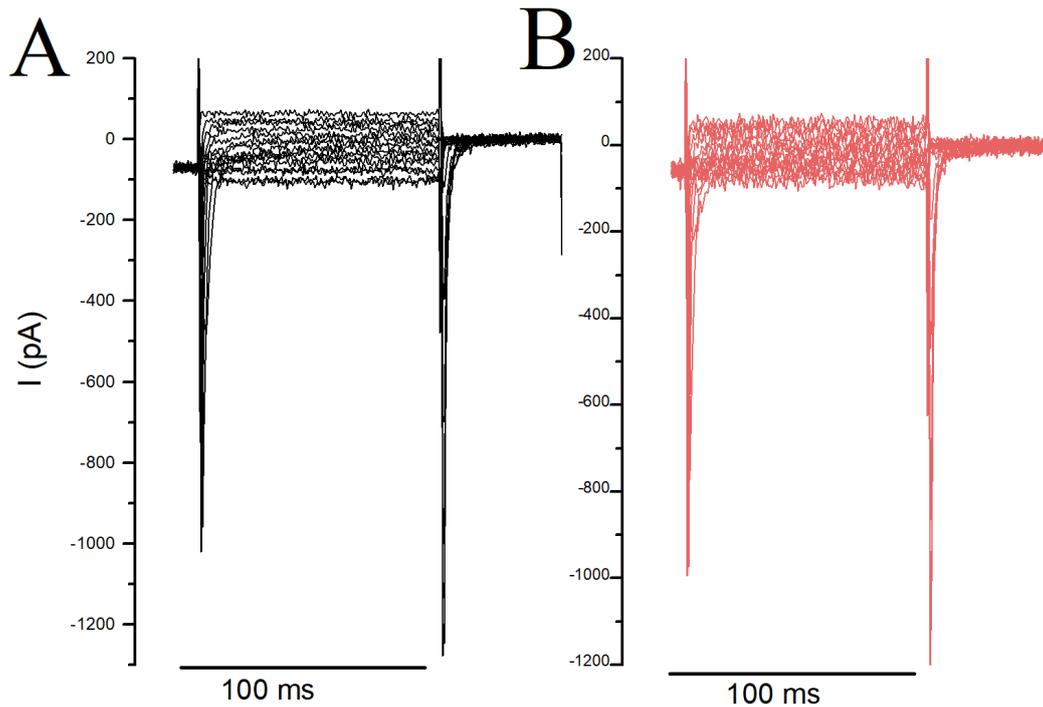
Al realizar el análisis de la corriente en el pulso fijo del protocolo se encontró que la normalización de la corriente  $I/I_{MAX}$  (Fig. 22C) no presentaba cambios significativos en presencia de algún compuesto con respecto al control. Para conocer la probabilidad de la apertura de los canales de sodio después de una inactivación, esto mejor conocido como "Corriente de ventana", se hizo un solapamiento de las curvas de  $I/I_{MAX}$  vs  $G/G_{MAX}$  (Fig. 22C) que gobiernan el canal de sodio y se encontró que estas corrientes de ventana no diferían entre sí.



**Figura 22. Efecto de SA4503 sobre el canal Nav1.7 a las 24 H postratamiento.** En A) gráficas de la densidad de corriente de Nav1.7 con el efecto de SA4503. Las corrientes se encuentran normalizadas con respecto a la capacitancia de cada célula. En B) efecto de SA4503 sobre las corrientes de Nav1.7 medido a 0 mV. En C) gráficas de conductancia normalizada ( $G/G_{MAX}$ ) e inactivación de corriente ( $I/I_{MAX}$ ) en la situación control y en presencia de SA4503. Los datos en control y con SA4503 fueron ajustados con la ecuación de Boltzmann.

### 6.3.2 Efecto de SA4503 después de 48 H sobre las corrientes generadas por el canal Nav1.7

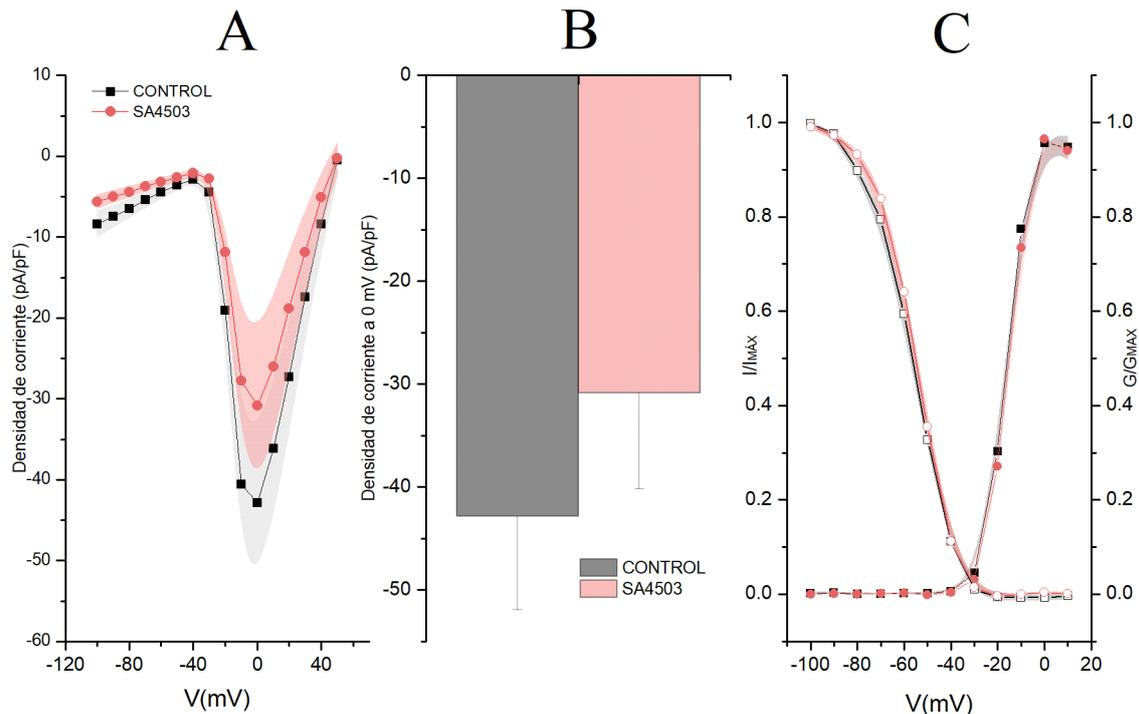
Al igual que para 24 H las corrientes control (Fig. 23A) y las corrientes con el compuesto SA4503 (Fig. 23B) no presentaron diferencias significativas después de estar con el compuesto en incubación durante 48 h.



**Figura 23. Efecto de SA4503 sobre las corrientes  $\text{Na}_v1.7$  a las 48 H postratamiento.** A) Registro representativo de las corrientes iónicas registradas en células control. B) Registro representativo del efecto del compuesto SA4503 sobre las corrientes iónicas generadas por el canal  $\text{Na}_v1.7$ .

Por su parte, al realizar la normalización de la corriente con la capacitancia celular para control y para la molécula SA4503 (Fig. 24A) y realizar una comparación de ambas densidades de corriente (Fig. 24B) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ; prueba t-Student no pareada) al igual que en 24h. Así mismo, en cuanto a la  $V_{1/2}$  de activación se desplazó ligeramente hacia valores más positivos de  $-16.5 \pm 0.3$  mV ( $n = 11$ ) en control a  $-15.7 \pm 0.6$  ( $n = 11$ ) en presencia de SA4503 (Fig. 24C).

En cuanto a la “corriente de ventana” de igual manera que a 24 H no se encontró diferencia alguna entre la condición control y la condición con SA4503.



**24. Efecto de SA4503 sobre el canal Nav1.7 tratamiento de 48 h.** En A) gráficas de la densidad de corriente de Nav1.7 con el efecto de SA4503. Las corrientes se encuentran normalizadas con respecto a la capacitancia de cada célula. En B) efecto de SA4503 sobre las corrientes de Nav1.7. En C) gráficas de conductancia normalizada ( $G/G_{MAX}$ ) e inactivación de corriente normalizada ( $I/I_{MAX}$ ) en la situación control y en presencia de SA4503. Los datos en control y con SA4503 fueron ajustados con la ecuación de Boltzmann.

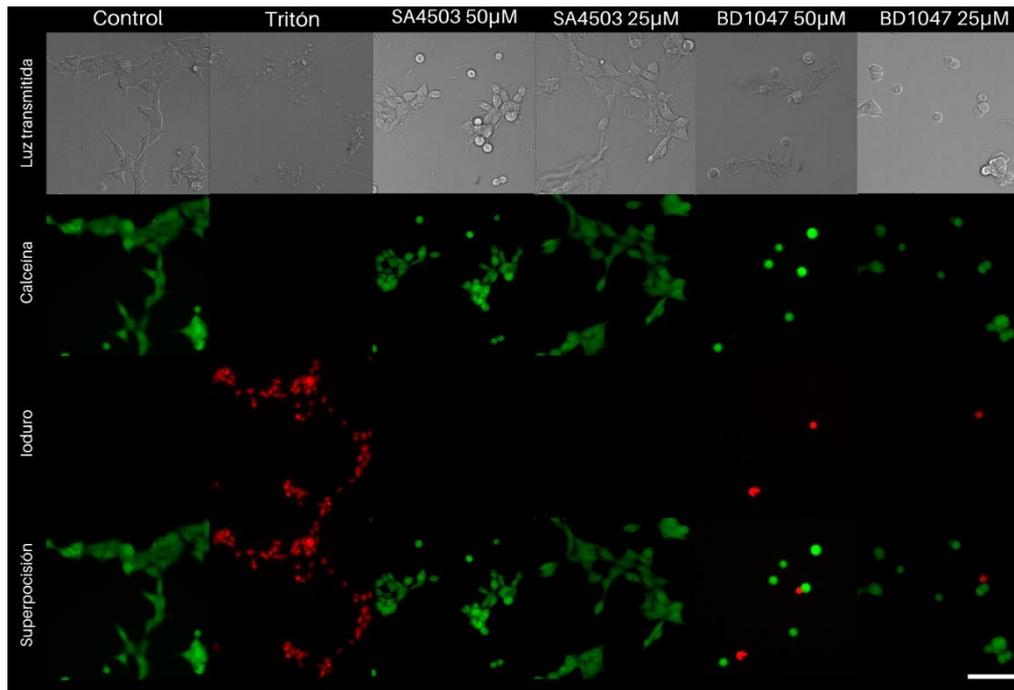
## 6.4 Efecto de las moléculas SA4503 y BD1047 sobre la viabilidad y morfología celular

Se estudió la emisión simultánea de 2 fluoróforos, para células HEK-WT y HEK-Kv10.1. La calceína-Verde emite fluorescencia únicamente cuando la membrana de las células se encuentra en buen estado y el yoduro de propidio que emite fluorescencia en el rango del rojo cuando la membrana se encuentra comprometida. En el caso de las células HEK-Nav1.7 se utilizó la calceína-Roja marcando así las células vivas y DAPI que emite fluorescencia azul cuando la membrana se encuentra comprometida. En este ensayo se utilizaron seis condiciones experimentales para cada una de las líneas celulares para las células HEK-WT Y HEK- Kv10.1 se utilizó un control positivo, Triton-100X (0.1%) como control negativo, SA4503 a 25 y 50  $\mu$ M y BD1047 igualmente a 25 y 50  $\mu$ M. En el caso de las células HEK-Nav1.7 se utilizó un control positivo, Triton-100X (0.1%) como control negativo, SA4503 a 10 y 25  $\mu$ M y BD1047 igualmente a 10 y 25  $\mu$ M. El conteo y el análisis de porcentaje de células vivas/muerta fue obtenido de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. Como control negativo (células muertas) se utilizó Tritón X-100 (0.1%), un surfactante el cual actúa como detergente y por lo cual es capaz de romper la continuidad de la membrana produciendo la muerte celular y con ello la entrada del marcador de células muertas. Para poder saber si la viabilidad celular cambia con los

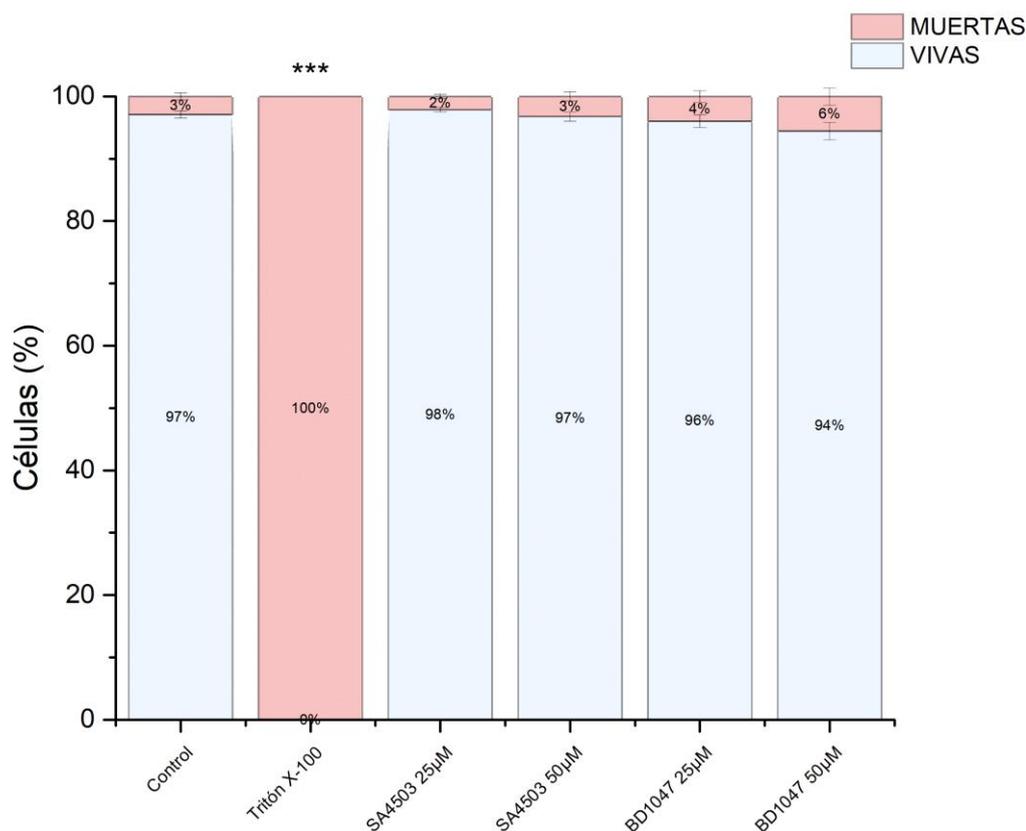
tratamientos, sus resultados se tienen que comparar con la viabilidad celular en condiciones normales de crecimiento (Control Positivo).

#### 6.4.1 Efecto de SA4503 Y BD1047 sobre la viabilidad de células HEK-WT después de 24 H de tratamiento.

La condición control presentó un porcentaje de células vivas de  $97.1 \pm 0.6 \%$  y pasadas las 24 H ninguno de los compuestos SA4503 o BD1047 mostró cambios significativos sobre la viabilidad celular a ninguna concentración ensayada.



**Figura 25. Ensayo de viabilidad de células HEK-WT.** Imágenes representativas de cada condición. Se muestra las imágenes con luz transmitida, células marcadas con calceína, células marcadas con Yoduro de Propidio y la superposición de Calceína y Yoduro de Propidio. La barra blanca representa 100 micrómetros.



**Figura 26. Ensayo de viabilidad en células HEK-WT.** Distribución en porcentaje de células muertas y vivas en porcentaje (n=3) para \*\*\*P<0.001 con una prueba ANOVA de una vía con post hoc de Dunnet para comparar los tratamientos con la situación control.

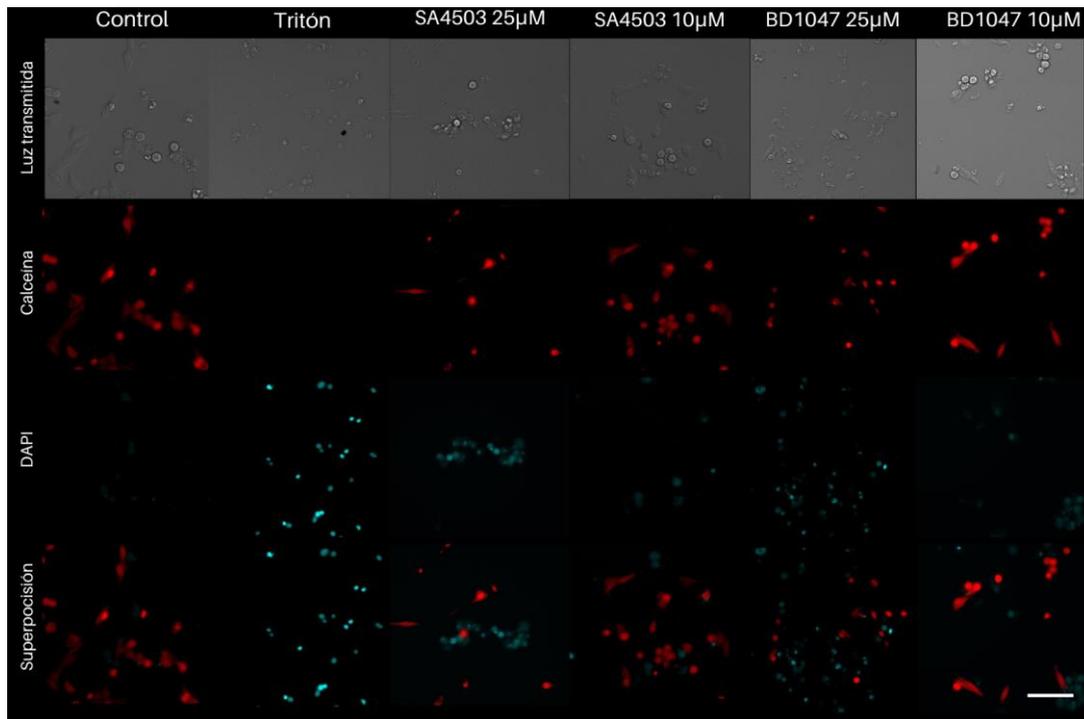
CONDICIÓN	CALCEÍNA+	DAPI+	N	P
CONTROL	97.11 ± 0.56	2.89 ± 0.56	3	>0.05
TRITÓN	0±0	100±0	3	<b>&lt;0.001</b>
SA4503 50µM	96.79 ± 0.75	3.208 ± 0.75	3	>0.05
SA4503 25µM	97.88 ± 0.34	2.123 ± 0.34	3	>0.05
BD1047 50µM	94.46 ± 1.38	5.544 ± 1.38	3	>0.05
BD1047 25µM	95.96 ± 0.99	3.942 ± 0.94	3	>0.05

**Tabla 5. Porcentaje de células HEK-WT en cada condición.** Valores de P obtenidos con una prueba ANOVA de una vía con post hoc de Dunnet, donde se compara cada tratamiento vs el control.

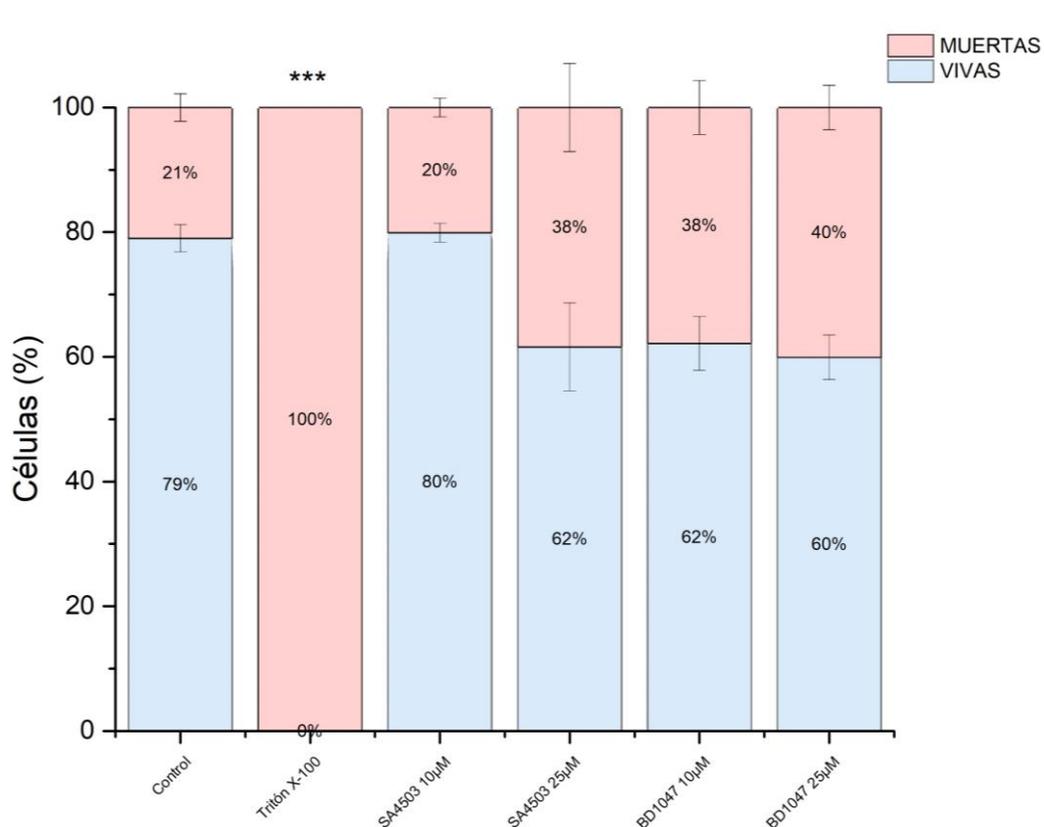
#### 6.4.2 Efecto de SA4503 Y BD1047 después de 24 H sobre la viabilidad de células HEK-Nav1.7

En condiciones normales se presentó un porcentaje de células vivas de 79.0 ± 2.2 % y pasadas las 24 H ninguno de los compuestos SA4503 o BD1047 mostró

cambios significativos sobre la viabilidad celular a ninguna concentración ensayada.



**Figura 27. Ensayo de viabilidad de células HEK-Nav1.7.** Imágenes representativas de cada condición. Se muestra las imágenes con luz transmitida, células marcadas con calceína detectadas en filtro Texas Red, células marcadas con DAPI y la superposición del canal Texas Red y DAPI. La barra blanca representa 100 micrómetros.



**Figura 28. Ensayo de viabilidad en células HEK-Nav1.7.** Distribución en porcentaje de células muertas y vivas en porcentaje (n=3) para \*\*\*P<0.001 con una prueba ANOVA de una vía con post hoc de Dunnet para comparar los tratamientos con la situación control.

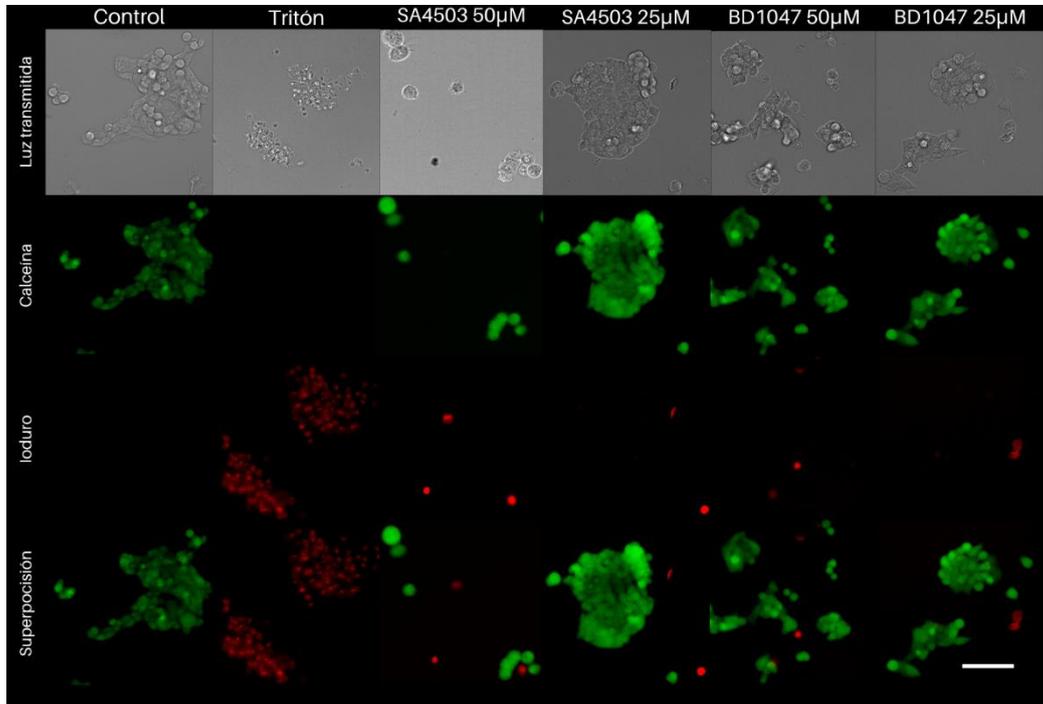
CONDICIÓN	CALCEÍNA+	DAPI+	N	P
CONTROL	79.03 ± 2.20	20.97 ± 2.20	3	>0.05
TRITÓN	0 ± 0	100 ± 0	3	<b>&lt;0.001</b>
SA4503 25µM	61.60 ± 7.08	38.40 ± 7.08	3	>0.05
SA4503 10µM	79.92 ± 1.50	20.08 ± 1.50	3	>0.05
BD1047 25µM	59.94 ± 3.57	40.06 ± 3.57	3	>0.05
BD1047 10µM	62.16 ± 4.32	37.84 ± 4.32	3	>0.05

**Tabla 6. Porcentaje de células HEK-Nav1.7 en cada condición.** Valores de P obtenidos con una prueba ANOVA de una vía con post hoc de Dunnet, donde se compara cada tratamiento vs el control.

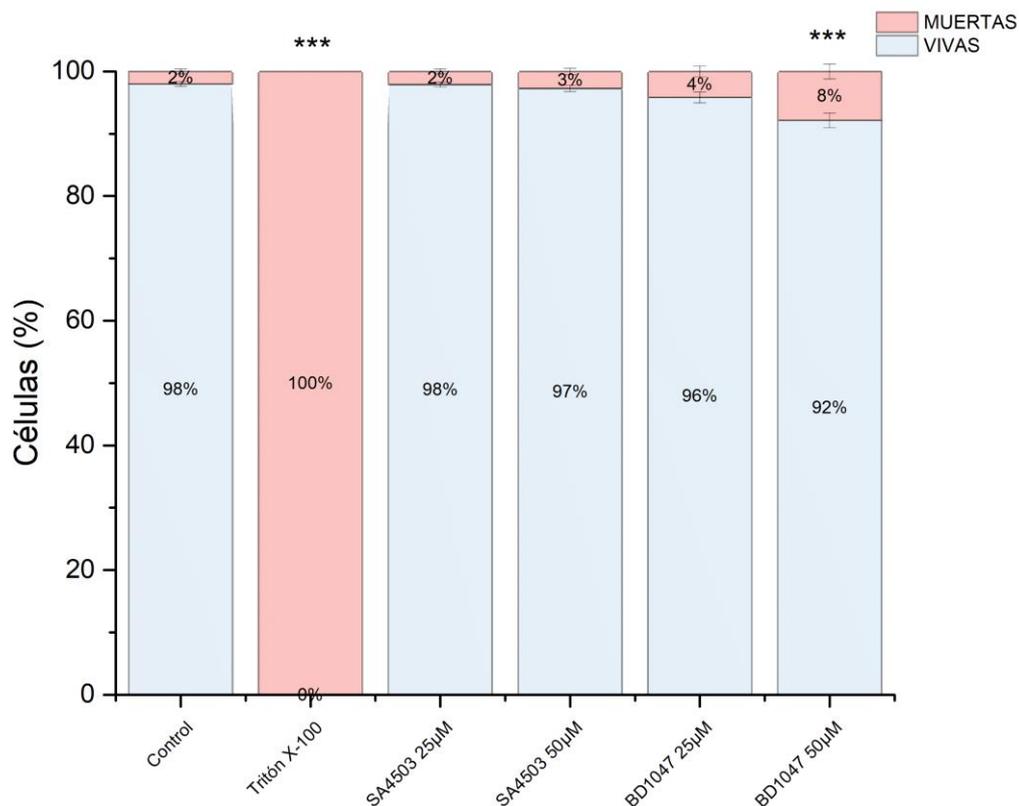
#### 6.4.3 Efecto de SA4503 Y BD1047 después de 24 H sobre la viabilidad de células HEK-Kv10.1

En condiciones normales el porcentaje de células vivas es de  $98.0 \pm 0.39$  %. Pasadas las 24 H se observó que el antagonista de Sig1R BD1047 a una concentración de 50 µM provocó cambios significativos ( $P > 0.05$ ; prueba ANOVA)

al incrementar el número de células muertas en los tratamientos. Por su parte SA4503 agonista de Sig1R a ninguna de las concentraciones incrementó la muerte celular de una manera significativa con respecto a la condición control.



**Figura 29. Ensayo de viabilidad de células HEK-Kv10.1.** Imágenes representativas de cada condición. Se muestra las imágenes con luz transmitida, células marcadas con calceína, células marcadas con Yoduro de Propidio y la superposición de Calceína y Yoduro de Propidio. La barra blanca representa 100 micrómetros.



**Figura 30. Ensayo de viabilidad en células HEK- Kv10.1.** Distribución en porcentaje de células muertas y vivas en porcentaje (n=3) para \*\*\* P<0.001 con una prueba ANOVA de una vía con post hoc de Dunnet para comparar los tratamientos con la situación control.

CONDICIÓN	CALCEÍNA+	DAPI+	N	P
CONTROL	98.00 ± 0.39	2.00 ± 0.39	3	>0.05
TRITÓN	0 ± 0	100 ± 0	3	<b>&lt;0.001</b>
SA4503 50µM	97.30 ± 0.52	2.70 ± 0.52	3	>0.05
SA4503 25µM	97.92 ± 0.38	2.08 ± 0.38	3	>0.05
BD1047 50µM	95.85 ± 0.88	4.150 ± 0.88	3	<b>&lt;0.001</b>
BD1047 25µM	92.16 ± 1.18	7.84 ± 1.18	3	>0.05

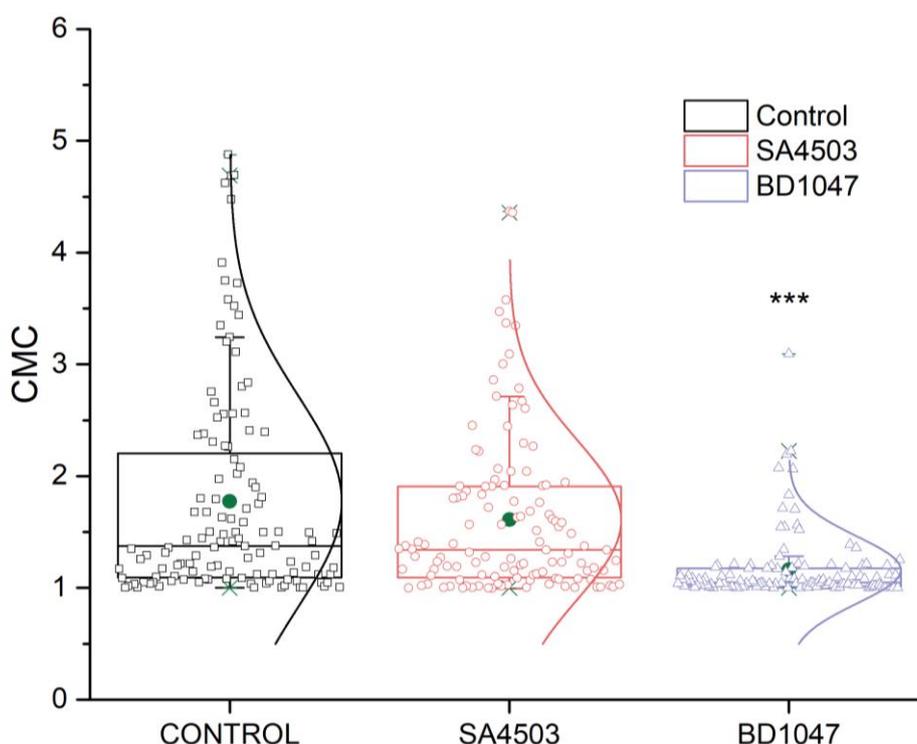
**Tabla 7. Porcentaje de células HEK- Kv10.1 en cada condición.** Valores de P obtenidos con una prueba ANOVA de una vía con post hoc de Dunnet, donde se compara cada tratamiento vs el control.

#### 6.4.4 Efecto de SA4503 Y BD1047 sobre la morfología celular de las líneas celulares HEK-WT, HEK-K<sub>v</sub>10.1 Y HEK-Na<sub>v</sub>1.7

Durante los experimentos de viabilidad celular parecía que las células expuestas al agonista y antagonista de Sig1R modificaban su morfología, por lo que decidimos evaluar este parámetro.

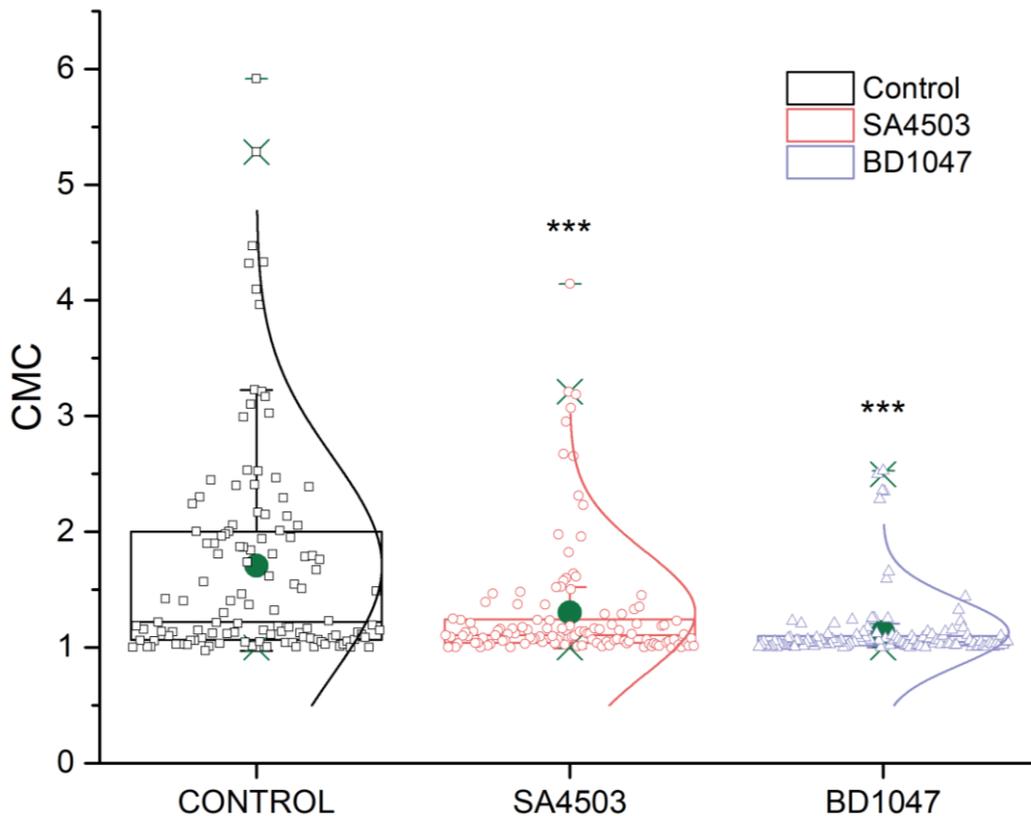
La remodelación estructural celular está estrechamente relacionada en procesos de adquisición de fenotipos cancerosos en donde se puede observar tasas de invasividad mayores que en células no cancerosas, el cociente indicativo de la morfología celular (CMC) nos ayuda a diferir la morfología de las células, aquellas que muestran un valor  $<0.9$  son células redondas, las células con valores  $<3$  se consideran células con morfología epitelial y aquellas con un CMC  $>3$  tienen una morfología típica de las células mesenquimales (Rojas-Sanchez et al., 2021).

Después de un tratamiento de 24 horas las células HEK-WT mostró diferencias morfológicas únicamente con el compuesto BD1047 a 50  $\mu$ M (n= 120). Para la situación control y con el compuesto SA4503 a 50  $\mu$ M (n= 120) los valores oscilaban principalmente entre 4 y 1, mientras que para el compuesto BD1047 los valores tendían entre 2 y 1.



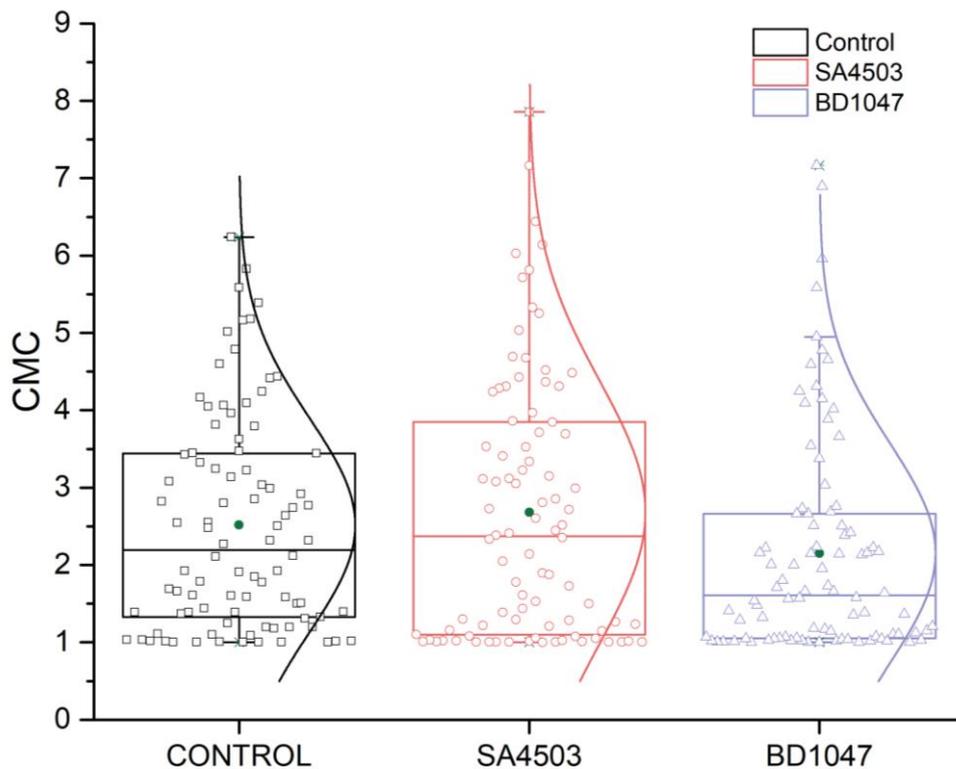
**Figura 31. CMC de las células HEK-WT.** Comparación entre células Control, SA4503 y BD1047 en células HEK-WT. Para comparar los tratamientos con la situación control se utilizó ANOVA de una vía con post hoc de Dunnet, comparaciones múltiples con respecto al control, \*\*\*P<0.001. Los datos se presentan en gráfica de caja y bigote

Para el caso de las células HEK-K<sub>v</sub>10.1 las células tratadas con SA4503 a 50  $\mu$ M (n= 120) Y BD1047 a 50  $\mu$ M (n= 120) presentaron cambios con respecto a la condición control, ambos compuestos llevaron el CMC a valores cercanos a 1.



**Figura 32. CMC de las células HEK-K<sub>v</sub>10.1.** Comparación entre células Control, SA4503 y BD1047 en células HEK-K<sub>v</sub>10.1. Para comparar los tratamientos con la situación control se utilizó ANOVA de una vía con post hoc de Dunnet, comparaciones múltiples con respecto al control, \*\*\*P<0.001. Los datos se presentan en gráfica de caja y bigote

Por su parte las células HEK-Nav1.7 ni SA4503 a 25  $\mu$ M (n= 120) ni BD1047 a 25  $\mu$ M (n= 120) presentó cambios con respecto al control.

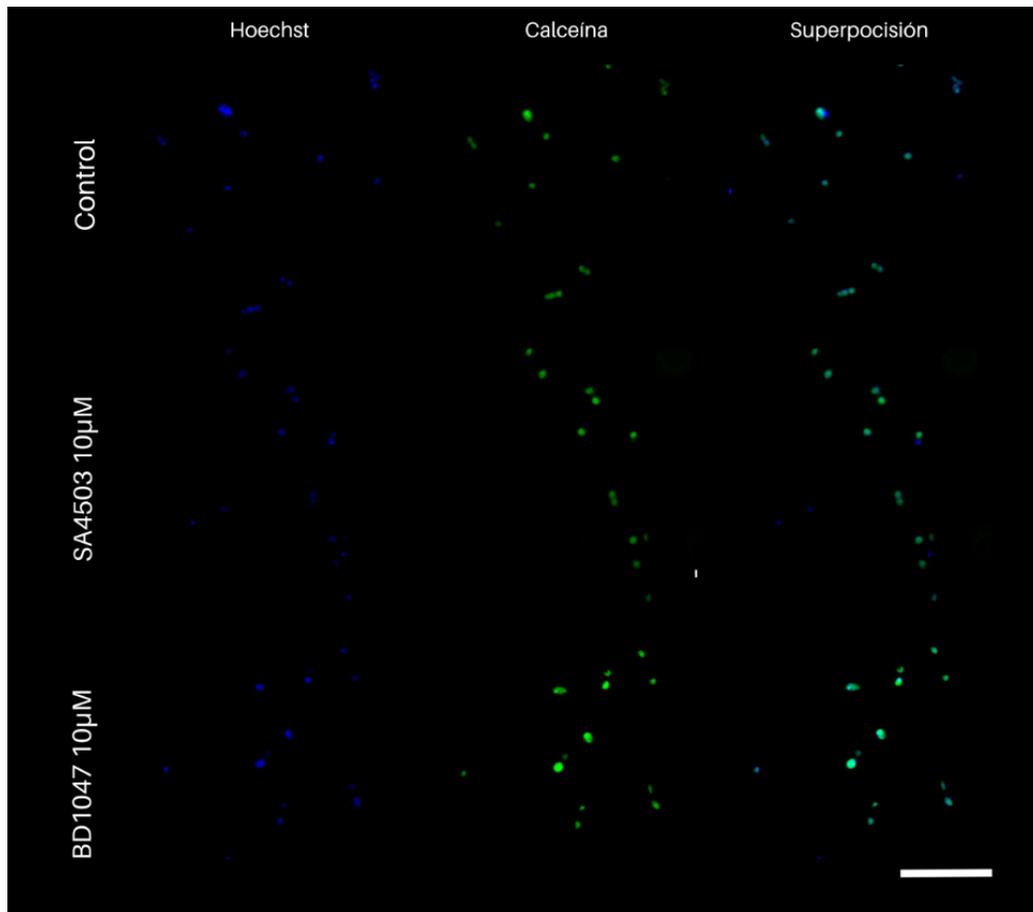


**Figura 33. CMC de las células HEK-Nav1.7.** Comparación entre células Control, SA4503 y BD1047 en células HEK-Nav1.7. Para comparar los tratamientos con la situación control se utilizó ANOVA de una vía con post hoc de Dunnet, comparaciones múltiples con respecto al control. Los datos se presentan en gráfica de caja y bigote

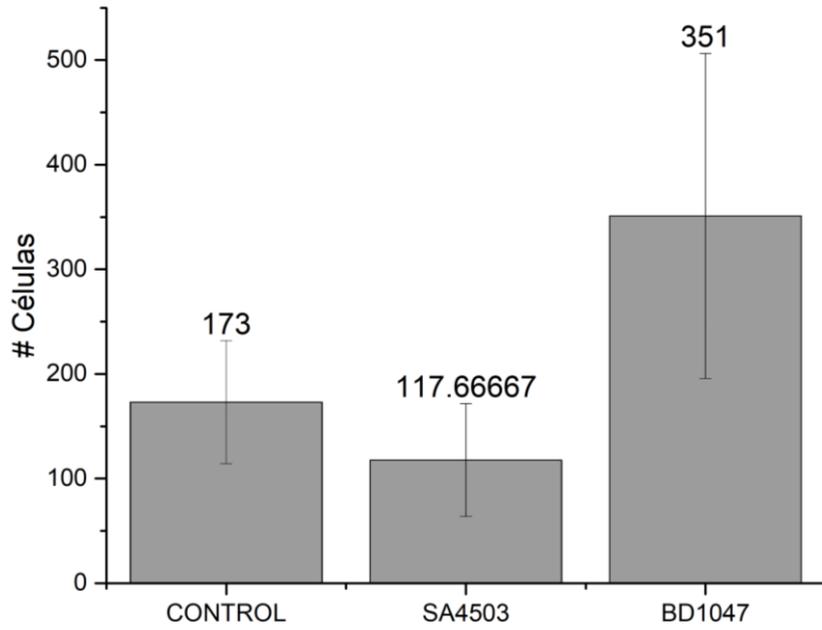
### 6.5 Efecto de SA4503 y BD1047 sobre la Invasividad celular de las células HEK-WT, HEK-K<sub>v</sub>10.1 y HEK-Nav1.7

Por último, para evaluar el efecto que los compuestos pueden estar presentando en la invasividad celular, se realizó en las tres diferentes líneas celulares (HEK-WT, HEK-HEK-K<sub>v</sub>10.1 y HEK-Nav1.7) un ensayo de invasividad en el cual se evaluaron los compuestos SA4503 Y BD1047 a 10  $\mu$ M. Los núcleos fueron marcados con Hoechst que se utiliza para la tinción de ADN pues es permeable a la célula. Para el caso de las células HEK-Nav1.7 debido a que estas expresan al gen reportero GFP no fue necesario añadirles calceína y para el caso de las células HEK-K<sub>v</sub>10.1 y HEK-WT las células fueron marcadas con calceína-AM verde. Lo anterior surgió de la búsqueda de células que lograran migrar a través de la membrana y sobrevivir, es por ello que únicamente contar las células vivas que fueron positivas a Hoechst y positivas a calceína-verde. Las imágenes fueron obtenidas con la ayuda del microscopio invertido ImageXpress 24 horas para todas las líneas celulares HEK-WT (Fig. 34), HEK-Nav1.7 (Fig. 36) y HEK-K<sub>v</sub>10.1 (Fig. 38).

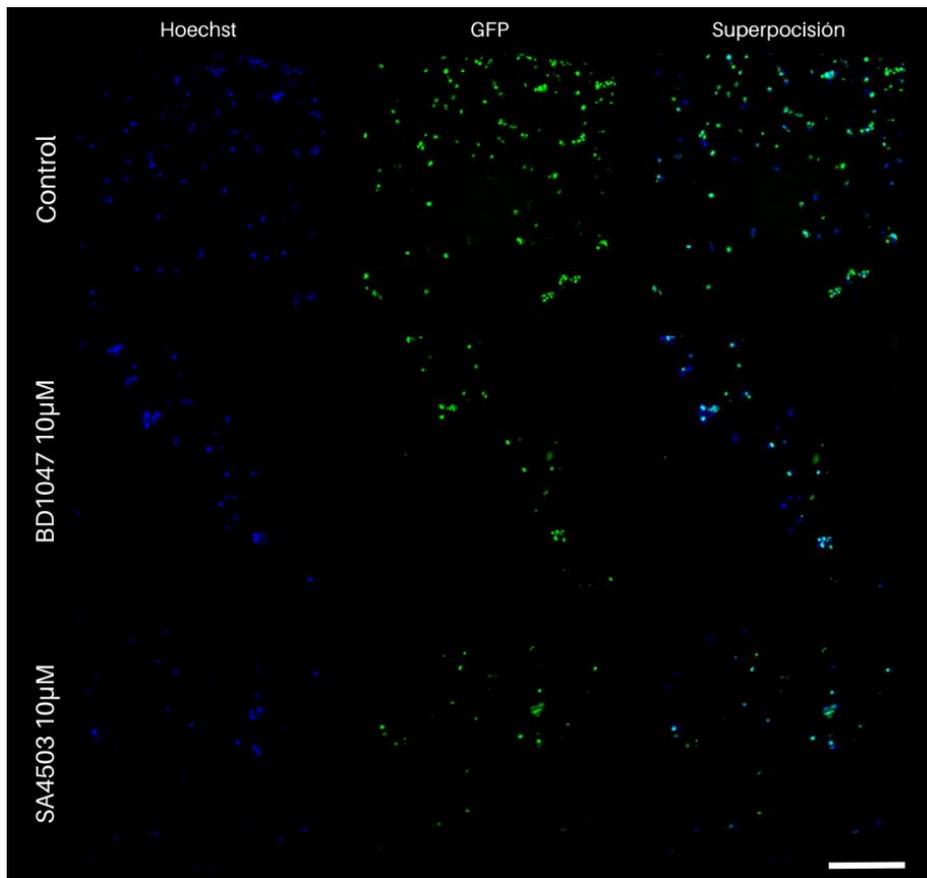
En ningún caso, al realizar un análisis estadístico como lo fue ANOVA de una vía, se observaron cambios estadísticamente significativos respecto al control, pero en los casos de HEK-Nav1.7 (Fig. 37) y HEK-Kv10.1 (Fig. 39) los resultados sugieren que el compuesto BD1047 disminuye la capacidad invasiva de estas células, lo cual no fue observado en las células HEK-WT (Fig. 35).



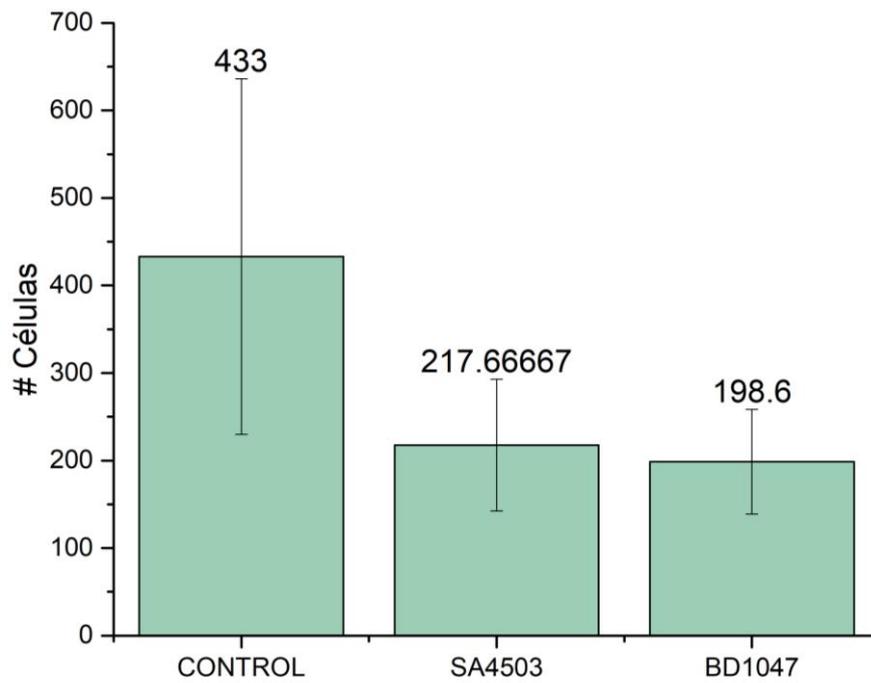
**Figura 34. Ensayo de invasividad de células HEK-WT.** Imágenes representativas de cada condición. Se muestra las imágenes de las células marcadas por Hoechst, células marcadas con calceína y la superposición de Hoechst y Calceína. La barra blanca representa 100 micrómetros.



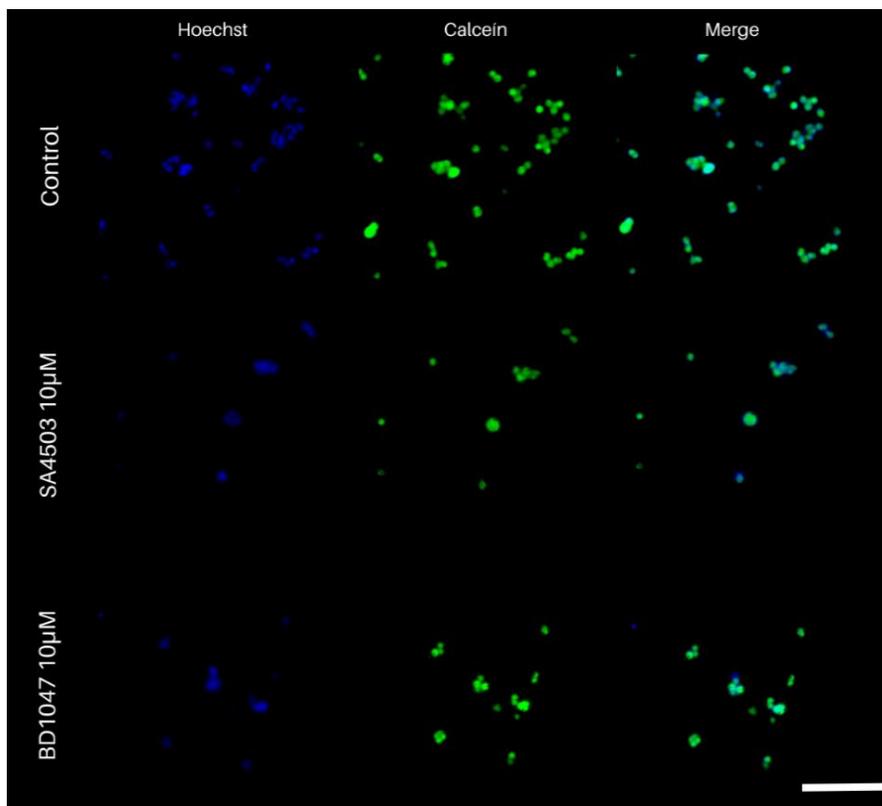
**Figura 35. Ensayo de invasividad de células HEK-WT.** Comparación de las condiciones control, SA4503 y BD1047 en donde se muestran los promedios  $\pm$  el error estándar, los resultados no fueron estadísticamente significativos.



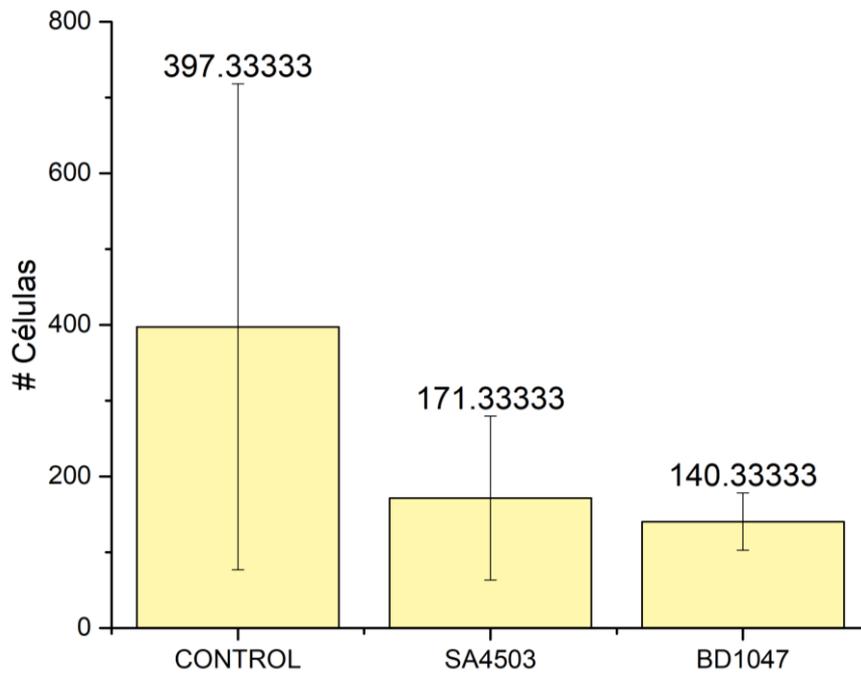
**Figura 36. Ensayo de invasividad de células HEK-Nav<sub>v</sub>1.7.** Imágenes representativas de cada condición. Se muestra las imágenes de las células marcadas por Hoechst, células con GFP y la superposición de Hoechst y Calceína. La barra blanca representa 100 micrómetros.



**Figura 37. Ensayo de invasividad de células HEK-Nav1.7.** Comparación de las condiciones control, SA4503 y BD1047 en donde se muestran los promedios  $\pm$  el error estándar, los resultados no fueron estadísticamente significativos.



**Figura 38. Ensayo de invasividad de células HEK-Kv10.1.** Imágenes representativas de cada condición. Se muestra las imágenes de las células marcadas por Hoechst, células marcadas con calceína y la superposición de Hoechst y Calceína. La barra blanca representa 100 micrómetros.



**Figura 39. Ensayo de invasividad de células HEK-K $\gamma$ 10.1.** Comparación de las condiciones control, SA4503 y BD1047 en donde se muestran los promedios  $\pm$  el error estándar, los resultados no fueron estadísticamente significativos.

## 7. Discusión

### 7.1 El receptor Sigma-1 y el cáncer

El receptor Sig1R es una proteína intracelular, anclada principalmente en el retículo endoplásmico, que es regulada por múltiples moléculas y que es capaz a su vez de regular la expresión de múltiples canales iónicos, los cuales están implicados en diversos fenómenos celulares, tanto en condiciones normales como en fisiopatológicos (Bravo, et al., 2019; Morales-Lázaro et al., 2019).

Sig1R muestra una expresión anómala en numerosos tipos de cáncer, donde parece regular *hallmarks* de cáncer (Robinson et al., 2023; Soriani et al., 2019), no obstante, dichas asociaciones aún no se comprenden claramente. En condiciones normales, está bien descrito que Sig1R modula la actividad de diversas familias de canales iónicos, por lo que existe la interrogante de si Sig1R pudiera modular a diversos canales iónicos en células tumorales. Para intentar direccionar esta pregunta, en la presente tesis se intentó identificar si los canales iónicos Kv10.1 y Nav1.7 pueden ser modulados por la actividad del receptor Sig1R, identificando que el canal Kv10.1 está sujeto a dicha regulación, pero no el Nav1.7.

Los canales iónicos son complejos macromoleculares que cumplen diversas funciones en todas las células de mamíferos. Su actividad puede modular prácticamente todos los fenómenos que mantienen la homeostasis celular. Por lo tanto, no es raro que el mal funcionamiento de estas proteínas (a través de ganancias o pérdidas de función) tenga un impacto significativo en el correcto funcionamiento de una célula, un órgano y el organismo completo. Es así que en los últimos años ha existido un crecimiento sustancial por parte de la industria farmacéutica, así como por parte de la academia, por encontrar nuevas formas de modular la actividad de dichas proteínas, tratando de eliminar de esta forma los efectos causados por su mal funcionamiento.

La gran mayoría de los canales iónicos son proteínas de membrana, lo que vuelve accesible muchas regiones de estos, y por lo tanto el diseño de fármacos puede ser relativamente más sencillo. La mayoría de los fármacos con acción sobre canales iónicos son moléculas pequeñas, las cuales muchas veces tienen efectos secundarios originado de la falta de selectividad, haciendo indispensable nuevos mecanismos de modulación de canales iónicos alterados o expresados de forma anómala.

En el caso de los canales activados por voltaje Kv10.1 y Nav1.7, estos canales comparten un alto grado de homología con el canal de Kv11.1 (expresado en corazón) y otros canales Nav (ampliamente distribuidos en tejido excitable), respectivamente, por los que las moléculas pequeñas o toxinas con actividad sobre estos, también pueden tener efectos secundarios debido a su poca especificidad. No obstante, ambos canales tienen una expresión bastante

restringida en tejido sano, lo que los hace un blanco prometedor para el desarrollo de nuevos compuestos o vías en la que puedan ser regulados para el tratamiento de enfermedades.

Dentro de los nuevos mecanismos de modulación, el Sig1R ha emergido como un blanco molecular para regular la actividad de diversos canales iónicos. No obstante, se desconocía si Sig1R puede regular al canal Kv10.1 y Nav1.7.

## **7.2 El receptor Sig1R regula la actividad del canal Kv10.1, pero no del Nav1.7**

Debido a lo reportado en la literatura, la cual describe la expresión endógena de Sig1R en la línea celular HEK293 (Ortiz-Rentería, 2018), decidimos evaluar si los agonistas y antagonistas selectivos del receptor Sig1R eran capaces de modular la actividad de los canales Kv10.1 y Nav1.7. En el caso del canal Kv10.1, la actividad funcional del canal fue modificada significativamente cuando la actividad de Sig1R era modulada farmacológicamente. Tanto los experimentos, a las 24 y 48 H de incubación con el agonista y antagonista de Sig1R redujeron la actividad del canal. Dichos efectos fueron muy parecidos a los reportados sobre otros canales de K<sup>+</sup>, como el Kv11.1 (hERG), Kv1.3, Kv1.4 (Kinoshita et al., 2012; Aydar et al., 2002; Balasuriya et al., 2014). No obstante, también ha sido descrito que Sig1R es capaz de incrementar la densidad de corriente del Kv11.1 cuando es expresado en oocitos de rana, efecto debido a un incremento en la traslocación de canales del retículo endoplásmico, conduciendo a un mayor número de canales en la membrana celular (Crottès et al., 2011). Debido a que múltiples canales de K<sup>+</sup>, entre ellos el Kv10.1, han sido descritos como promotores de la carcinogénesis, resulta interesante averiguar si el receptor Sig1R modula la expresión y actividad de este canal iónico, sugiriendo un nuevo mecanismo de regulación.

Además, a través de microscopia de fuerza atómica se ha demostrado que Sig1R y el canal Kv11.1 interactúan de forma directa; y que la principal interacción es con los canales Kv11.1 (inmaduros) que no se encuentran glicosilados (Balasuriya et al., 2014).

Por otra parte, existen reportes de la inhibición de los canales de sodio Nav1.2, Nav1.4, y Nav1.5 en presencia de agonistas del Sig1R. Así como se mencionó arriba, se ha sugerido sobre el posible papel del Sig1R en la carcinogénesis; en particular, se ha demostrado que la modulación del Sig1R puede afectar la metástasis a través de una interacción directa de estos receptores con canales de sodio dependientes de voltaje (Crottès et al., 2013). Al igual que con el Kv11.1, se ha demostrado, a través de ensayos de co-inmunoprecipitación que Sig1R es capaz de interactuar de forma directa con el canal neonatal Nav1.5 (Balasuriya et al., 2012).

Sin embargo, a pesar de que existe una homología entre Nav1.7 y Nav1.5 de más del 50%, Nav1.7 no mostró cambios en la actividad funcional del canal al modular a la Sig1R con el agonista y el antagonista.

### **7.3 La modulación de Sig1R provoca cambios en la viabilidad de las células HEK-Kv10.1 pero no en HEK-Nav1.7 y HEK-WT**

Se ha estudiado y probado la eficacia potencial de los fármacos moduladores de Sig1R sobre la proliferación y supervivencia de células tumorales *in vitro* (Aydar et al., 2004), esto debido a que Sig1R se ve involucrada en múltiples procesos necesarios para la supervivencia celular, al encontrarse en la membrana del retículo endoplásmico, la cual es importante en el transporte de lípidos y en la señalización de Ca<sup>2+</sup>, la eliminación de Sig1R ha dado como resultado la activación de proteínas sensoras de estrés del retículo endoplásmico y la regulación a la baja de proteínas antiapoptóticas y desencadena la muerte de las células cancerosas a través de la desestabilización de las mitocondrias (Tesei et al., 2018; Hayashi, 2019).

Se consideró analizar la viabilidad celular de las líneas celulares cuando se encuentran en presencia del agonista y antagonista de Sig1R. Se encontró que BD1047 a 50 µM en HEK-Kv10.1 afectó en la viabilidad celular, en células las líneas celulares HEK-Nav1.7 y HEK-WT no se mostró cambios significativos en la viabilidad celular para ninguna de las condiciones. Esto quiere decir que la reducción de la magnitud de la corriente iónica de Kv10.11 probablemente afecta la capacidad de las células para continuar con los procesos metabólicos que permiten a las células ser viables. Por otra parte, que la viabilidad de las células HEK-WT no se vea afectada nos conduce a pensar que el compuesto no tendría la capacidad de afectar la viabilidad de células sanas que como las como lo son las HEK-WT las cuales no expresan el Kv10.1.

En cuanto a Nav1.7 se encontró que la modulación de Sigma-1 por el agonista y el antagonista no afectó la viabilidad celular, de manera que no tuvo efectos citotóxicos.

### **7.4 La modulación del receptor Sig1R es capaz de cambiar la morfología celular en células con el canal Kv10.1 pero no en células con Nav1.7**

Se conoce que las células tumorales aprovechan las múltiples vías celulares con el fin de sobrevivir e invadir el tejido. Es de esta forma que las células son capaces de entrar en un proceso de transdiferenciación al cual se le conoce como transición epitelio-mesénquima (Rojas-Sánchez et al., 2021). Es en este proceso donde las células epiteliales pasan de un estado inmovil con uniones estrechas entre sí mismas y la matriz extracelular (lo cual hace que se preserve la polaridad apical-basal) a un estado mesenquimal, el cual se caracteriza por la adquisición de un fenotipo parecido al de los fibroblastos, es decir, una morfología más alargada (Yang et al., 2020). A su vez, se ha encontrado que los receptores Sigma son capaces de provocar cambios estructurales en varios tipos

de células como los gliomas gracias a cambios en las proteínas citoesqueléticas (Vilner et al., 1995).

De acuerdo con los resultados se encontró que la modulación de Sig1R a partir de SA4503 y BD1047 a 50  $\mu\text{M}$  para HEK-Kv10.1 es capaz de contrarrestar el establecimiento de la polaridad celular lo que lleva a una disminución a su vez de la capacidad de migración celular, por su parte, BD1047 fue el único compuesto que a 50  $\mu\text{M}$  logró provocar el mismo efecto en las células HEK-WT. Para el caso de las células HEK-Nav1.7 ninguna de las moléculas fue capaz de provocar un cambio estadísticamente significativo sobre la morfología celular.

Sin embargo, debido a que la transición epitelio-mesénquima se induce gracias a la represión de genes que codifican componentes esenciales para las uniones intracelulares y no sólo por la actividad de los canales es necesario realizar más pruebas para confirmar que los cambios morfológicos se deben por la remodelación del citoesqueleto o la supresión de proteínas de adhesión celular tales como la E-Cadherina (Rajasekaran et al., 2009; Ribatti et al., 2020).

### **7.5 La modulación de Sig1R no es capaz de afectar la migración celular en células HEK-WT, HEK-Kv10.1 y HEK-Nav1.7**

Sig1R puede desempeñar un papel en la organización del citoesqueleto de actina controlando el funcionamiento de proteínas citoesqueléticas como las anquirinas, las cuales funcionan como una proteína adaptadora de membrana, conectando las proteínas de la membrana celular al citoesqueleto de espectrina-actina, implicándola así en la migración celular (Megalizzi et al., 2007; Hall et al., 2016). Siendo de esta forma que anteriormente se demostró que mediante el uso de un agonista selectivo del Sig1R en células como U373-MG GBM, A549 NSCLC y PC3 se presentaban efectos antimigratorios de manera significativa (Megalizzi et al., 2007). Sin embargo, en este estudio el antagonista y agonista de Sig1R no fueron capaces de provocar algún cambio significativo en la invasividad celular en ninguna de las líneas celulares, no obstante, en células HEK-Kv10.1 y HEK-Nav1.7 se nota una tendencia a la disminución de la migración con ambos compuestos.

En resumen, este trabajo muestra que el canal Kv10.1 puede ser sujeto a regulación a través del receptor Sig1R. Este nuevo mecanismo puede abrir las posibilidades a nuevas formas de regulación del canal en todos aquellos tejidos en donde se encuentra sobreexpresado, principalmente tejido tumoral. Adicionalmente, se muestra que no todos los canales iónicos están sujetos a la regulación por Sig1R, como lo muestran los resultados en la línea celular con expresión del canal Nav1.7.

### **7.6 Perspectivas de trabajo**

1. Estudiar la expresión del receptor sigma en líneas celulares de cáncer de próstata, en las cuales ha sido descrito la sobreexpresión del canal Kv10.1 y Nav1.7.

2. Estudiar si la modulación del receptor Sig1R puede modificar diversos *hallmarks* en líneas celulares cáncer de próstata.
3. Estudiar si la modulación farmacológica del receptor Sig1R es capaz modificar la expresión funcional de canales iónicos expresados líneas celulares de cáncer de próstata.
4. Estudiar si Sig1R promueve la expresión de canales Kv10.1 “maduros”.

## 8. Conclusiones

- El receptor Sigma-1 se expresa en las células HEK-293.
- La modulación farmacológica del receptor Sigma-1, a través del uso de agonistas y antagonistas, disminuyen la densidad de corriente del canal Kv10.1, tanto a las 24 como a las 48 H postratamiento. Ambos tratamientos desplazan el  $V_{1/2}$  de activación del canal hacia valores más negativos.
- Por el contrario, ni el agonista ni el antagonista de Sigma-1 tuvieron efectos sobre la expresión funcional de canal Nav1.7, en ninguna de las condiciones experimentales.
- El tratamiento con BD1047 a 50  $\mu$ M aumentó la mortalidad de las células HEK-Kv10.1 después de 24 H de incubación.
- Las líneas celulares HEK-WT y HEK-Nav1.7 no presentaron cambios en la viabilidad celular después de 24 H de incubación con las moléculas.
- Ninguna de las líneas celulares presentó cambios significativos en la invasividad celular después de 24 H de incubación con las moléculas, sin embargo, parece haber una tendencia a la disminución de la capacidad invasiva en las células HEK-Kv10.1 y HEK-Nav1.7.
- El antagonista de Sigma-1, BD1047, produjo cambios en la morfología de las células HEK-WT y HEK-Kv10.1, hacia un fenotipo de célula epitelial.
- Ninguna de las moléculas afectó la morfología de las células HEK-Nav1.7.

## 9. Bibliografía

- Abraham, M. J., Fleming, K. L., Raymond, S., Wong, A. Y., & Bergeron, R. (2019). The sigma-1 receptor behaves as an atypical auxiliary subunit to modulate the functional characteristics of Kv1.2 channels expressed in HEK293 cells. *Physiological Reports*, 7(12), e14147.
- Armstrong, C., & Hille, B. (1998). Voltage-gated ion channels and electrical excitability. *Neuron*, 20(3), 371-380.
- Aydar E, Palmer CP, Djamgoz MB (2004) Sigma receptors and cancer: possible involvement of ion channels. *Cancer Res* 64:5029–5035
- Aydar, E., Palmer, C. P., Klyachko, V. A., & Jackson, M. B. (2002). The sigma receptor as a ligand-regulated auxiliary potassium channel subunit. *Neuron*, 34(3), 399-410.
- Balasuriya, D., D'Sa, L., Talker, R., Dupuis, E., Maurin, F., Martin, P., Borgese, F., Soriani, O., & Edwardson, J. M. (2014). A Direct Interaction between the Sigma-1 Receptor and the hERG Voltage-gated K<sup>+</sup> Channel Revealed by Atomic Force Microscopy and Homogeneous Time-resolved Fluorescence (HTRF®). *Journal of Biological Chemistry*, 289(46), 32353–32363. <https://doi.org/10.1074/jbc.m114.603506>
- Balasuriya, D., Stewart, A. P., Crottès, D., Borgèse, F., Soriani, O., & Edwardson, J. M. (2012). The Sigma-1 Receptor Binds to the Nav1.5 Voltage-gated Na<sup>+</sup> Channel with 4-Fold Symmetry. *Journal Of Biological Chemistry/The Journal Of Biological Chemistry*, 287(44), 37021-37029. <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.382077>
- Barker, B. S., Young, G. T., Soubrane, C., Stephens, G. J., Stevens, E. B., & Patel, M. K. (2017). Ion channels. En Elsevier eBooks (pp. 11-43). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802381-5.00002-6>
- Barros, F., de la Peña, P., Domínguez, P., Sierra, L. M., & Pardo, L. A. (2020). The EAG voltage-dependent K<sup>+</sup> channel subfamily: similarities and differences in structural organization and gating. *Frontiers in pharmacology*, 11, 411. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00411>
- Bauer, C. K., & Schwarz, J. R. (2001). Physiology of EAG K<sup>+</sup> channels. *The Journal of membrane biology*, 182(1), 1-15. <https://doi.org/10.1007/s00232-001-0031-3>
- Bauer, C. K., & Schwarz, J. R. (2018). Ether-à-go-go K<sup>+</sup> channels: effective modulators of neuronal excitability. *The Journal of Physiology*, 596(5), 769-783. <https://doi.org/10.1113/jp275477>
- Bennett, D. L., Clark, A. J., Huang, J., Waxman, S. G., & Dib-Hajj, S. D. (2019). The Role of Voltage-Gated Sodium Channels in Pain Signaling. *Physiological Reviews*, 99(2), 1079–1151. doi:10.1152/physrev.00052.2017
- Bernard, G., & Shevell, M. I. (2008). Channelopathies: A Review. *Pediatric Neurology*, 38(2), 73–85. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2007.09.007
- Bezanilla, F. (2000). The Voltage Sensor in Voltage-Dependent Ion Channels. *Physiological Reviews*, 80(2), 555–592. doi:10.1152/physrev.2000.80.2.555
- Han, B., Tokay, T., Zhang, G., Sun, P., & Hou, S. (2017). Eag1 K<sup>+</sup>Channel: Endogenous Regulation and Functions in Nervous System. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 2017, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2017/7371010>
- Borde, P., Cosgrove, N., Charmsaz, S., Safrany, S. T., & Young, L. S. (2022). An investigation of Sigma-1 receptor expression and ligand-induced endoplasmic reticulum stress in breast cancer. *Cancer Gene Therapy*, 30(2), 368-374. <https://doi.org/10.1038/s41417-022-00552-4>
- Börgers, C. (2017). An Introduction to Modeling Neuronal Dynamics. Springer. 23-29.
- Bravo-Caparrós, I., Perazzoli, G., Yeste, S., Cikes, D., Baeyens, J. M., Cobos, E. J., & Nieto, F. R. (2019). Sigma-1 Receptor Inhibition Reduces Neuropathic Pain Induced by Partial Sciatic Nerve Transection in Mice by Opioid-Dependent and -Independent Mechanisms. *Frontiers in pharmacology*, 10, 613.
- Brimson, J. M., Akula, K. K., Abbas, H., Ferry, D., Kulkarni, S. K., Russell, S., Tisdale, M. J., & Safrany, S. T. (2020). Simple ammonium salts acting on sigma-1 receptors yield potential treatments for cancer and depression. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65849-6>

- Brüggemann, A., Pardo, L. A., Stühmer, W., & Pongs, O. (1993). Ether-à-go-go encodes a voltage-gated channel permeable to K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> and modulated by cAMP. *Nature*, 365(6445), 445-448. <https://doi.org/10.1038/365445a0>
- Camacho, J. (2006). Ether à go-go potassium channels and cancer. In *Cancer Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.02.016>
- Carnally, S. M., Johannessen, M., Henderson, R. M., Jackson, M. B., & Edwardson, J. M. (2010). Demonstration of a direct interaction between  $\sigma$ -1 receptors and acid-sensing ion channels. *Biophysical journal*, 98(7), 1182-1191.
- Catterall, W. A., Goldin, A. L., & Waxman, S. G. (2005). International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacological reviews*, 57(4), 397-409. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.4>
- Catterall, W. y Epstein, PN (1992). Canales iónicos. *Diabetología*, 35 (2), S23-S33.
- Cázares-Ordoñez, V., & Pardo, L. A. (2017). Kv10.1 potassium channel: from the brain to the tumors. *Biochemistry And Cell Biology*, 95(5), 531-536. <https://doi.org/10.1139/bcb-2017-0062>
- Chen, Y., Sánchez, A., Rubio, M. E., Kohl, T., Pardo, L. A., & Stühmer, W. (2011). Functional K(v)10.1 channels localize to the inner nuclear membrane. *PLoS one*, 6(5), e19257. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019257>
- Hübner, C. A., & Jentsch, T. J. (2002). Ion channel diseases. *Human Molecular Genetics*, 11(20), 2435-2445. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.20.2435>
- Chu, U. B., & Ruoho, A. E. (2015). Biochemical Pharmacology of the Sigma-1 Receptor. *Molecular Pharmacology*, 89(1), 142-153. <https://doi.org/10.1124/mol.115.101170>
- Church, J., & Fletcher, E. J. (1995). Blockade by sigma site ligands of high voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels in rat and mouse cultured hippocampal pyramidal neurones. *British journal of pharmacology*, 116(7), 2801-2810.
- Cone, C. D. (1971). Unified theory on the basic mechanism of normal mitotic control and oncogenesis. *Journal Of Theoretical Biology*, 30(1), 151-181. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(71\)90042-7](https://doi.org/10.1016/0022-5193(71)90042-7)
- Cox, J., Reimann, F., Nicholas, A. et al. (2006). An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature* 444, 894-898. <https://doi.org/10.1038/nature05413>
- Cregg, R., Momin, A., Rugiero, F., Wood, J. N., & Zhao, J. (2010). Pain channelopathies. *The Journal of Physiology*, 588(11), 1897-1904. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.187807>
- Crottès, D., Guizouarn, H., Martin, P., Borgese, F., & Soriani, O. (2013). The sigma-1 receptor: a regulator of cancer cell electrical plasticity?. *Frontiers in physiology*, 4, 175. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00175>
- Crottès, D., Martial, S., Rapetti-Mauss, R., Pisani, D. F., Loriol, C., Pellissier, B., Martin, P., Chevet, É., Borgèse, F., & Soriani, O. (2011). Sig1R Protein Regulates hERG Channel Expression through a Post-translational Mechanism in Leukemic Cells. *Journal Of Biological Chemistry*, 286(32), 27947-27958. <https://doi.org/10.1074/jbc.m111.226738>
- De Lera Ruiz, M., & Kraus, R. L. (2015). Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(18), 7093-7118. doi:10.1021/jm501981g
- Dib-Hajj, S. D., Cummins, T. R., Black, J. A., & Waxman, S. G. (2007). From genes to pain: Na v 1.7 and human pain disorders. *Trends in neurosciences*, 30(11), 555-563. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.08.004>
- Dib-Hajj, S. D., Yang, Y., Black, J. A., & Waxman, S. G. (2012). The NaV1.7 sodium channel: from molecule to man. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(1), 49-62. <https://doi.org/10.1038/nrn3404>
- Downie, B. R., Sánchez, A., Knötgen, H., Contreras-Jurado, C., Gymnopoulos, M., Weber, C., ... & Pardo, L. A. (2008). Eag1 expression interferes with hypoxia homeostasis and induces angiogenesis in tumors. *Journal of Biological Chemistry*, 283(52), 36234-36240.
- Doyle, D. A., Cabral, J. M., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait B. T. & MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science*, 280(5360), 69-77.
- Dueñas, M., Ojeda, B., Salazar, A., Mico, J. A., & Failde, I. (2016). A review of chronic pain impact on patients, their social environment and the health care system. *Journal of pain research*, 9, 457-467. <https://doi.org/10.2147/JPR.S105892>

- Eagles, D. A., Chow, C. Y., & King, G. F. (2020). Fifteen years of  $\text{Na}^+$  1.7 channels as an analgesic target: Why has excellent in vitro pharmacology not translated into in vivo analgesic efficacy?. *British Journal of Pharmacology*, 179(14), 3592–3611. <https://doi.org/10.1111/bph.15327>
- Emery, E., Luiz, A. & Wood, J. (2016) Nav1.7 and other voltage-gated sodium channels as drug targets for pain relief, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 20:8, 975-983, DOI: 10.1517/14728222.2016.1162295
- Gandhi, C. and Isacoff, E. (2002). Molecular models of voltage sensing. *J. Gen. Physiol.* 120, 455–463
- Gao, X. F., Yao, J. J., He, Y. L., Hu, C., & Mei, Y. A. (2012). Sigma-1 receptor agonists directly inhibit Nav1.2/1.4 channels. *PLoS one*, 7(11), e49384.
- Gómez-Herrera, M.A., Patlán, E., Estrada-Garrido, A., Hernández-Cruz, A., & Luis, E. (2023). Fluorescent membrane potential assay for drug screening on Kv10.1 channel: identification of BL-1249 as a channel activator. *Frontiers in Pharmacology*, 14.
- Gómez-Varela, D., Zwick-Wallasch, E., Knötgen, H., Sánchez, A., Hettmann, T., Ossipov, D., Weseloh, R., Contreras-Jurado, C., Rothe, M., Stühmer, W., Pardo, L. A. (2007). Monoclonal antibody blockade of the human Eag1 potassium channel function exerts antitumor activity. *Cancer Research*, 67(15), 7343-7349. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0107>
- Gripp, K. W., Smithson, S. F., Scurr, I. J., Baptista, J., Majumdar, A., Pierre, G., Williams, M., Henderson, L. B., Wentzensen, I. M., McLaughlin, H., Leeuwen, L., Simon, M. E. H., van Binsbergen, E., Dinulos, M. B. P., Kaplan, J. D., McRae, A., Superti-Furga, A., Good, J.-M., & Kutsche, K. (2021). Syndromic disorders caused by gain-of-function variants in KCNH1, KCNK4, and KCNN3—a subgroup of K<sup>+</sup> channelopathies. *European Journal of Human Genetics*, 29(9), 1384–1395. <https://doi.org/10.1038/s41431-021-00818-9>
- Hall, A. E., Lu, W. T., Godfrey, J. D., Antonov, A. V., Paicu, C., Moxon, S., Dalmy, T., Wilczynska, A., Muller, P. A., & Bushell, M. (2016). The cytoskeleton adaptor protein ankyrin-1 is upregulated by p53 following DNA damage and alters cell migration. *Cell death & disease*, 7(4), e2184. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.91>
- Hameed, S. (2019). Nav1.7 and Nav1.8: Role in the pathophysiology of pain. *Molecular Pain*. <https://doi.org/10.1177/1744806919858801>
- Hanner, M., Moebius, F. F., Flandorfer, A., Knaus, H., Striessnig, J., Kempner, E. S., & Glossmann, H. (1996). Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma1-binding site. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 93(15), 8072-8077. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.15.8072>
- Hayashi, T. (2015). Sigma-1 receptor: The novel intracellular target of neuropsychotropic drugs. *Journal of Pharmacological Sciences*, 127(1), 2–5. doi:10.1016/j.jphs.2014.07.001
- Hayashi, T. (2019). The Sigma-1 Receptor in Cellular Stress Signaling. *Frontiers In Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00733>
- Hayashi, T., & Su, T. (2007). Sigma-1 Receptor Chaperones at the ER- Mitochondrion Interface Regulate Ca<sup>2+</sup> Signaling and Cell Survival. *Cell*, 131(3), 596-610. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.036>
- Hille, B. (2001). *Ion Channel Excitable Membranes*. 3rd Edition, Sunderland. Massachusetts USA.
- Hodgkin, A. L.; Huxley, A. F. y Katz, B. (1952). Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*, *Journal of Physiology* 116, 424–448.
- Huang, X., & Jan, L. Y. (2014). Targeting potassium channels in cancer. *Journal of Cell Biology*, 206(2), 151-162. <https://doi.org/10.1083/jcb.201404136>
- Ishikawa, M., & Hashimoto, K. (2010). The role of sigma-1 receptors in the pathophysiology of neuropsychiatric diseases. *J Receptor Ligand Channel Res*, 3, 25-36.
- Johannessen, M., Ramachandran, S., Riemer, L., Ramos-Serrano, A., Ruoho, A. E., & Jackson, M. B. (2009). Voltage-gated sodium channel modulation by  $\sigma$ -receptors in cardiac myocytes and heterologous systems. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 296(5), C1049–C1057. doi:10.1152/ajpcell.00431.2008
- Kaczmarek, L. K. (2006). Non-conducting functions of voltage-gated ion channels. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(10), 761-771. <https://doi.org/10.1038/nrn1988>

- Kaplan, W. D., & Trout, W. E., 3rd (1969). The behavior of four neurological mutants of *Drosophila*. *Genetics*, 61(2), 399–409. <https://doi.org/10.1093/genetics/61.2.399>
- Kessi, M., Chen, B., Peng, J., Tang, Y., Olatoutou, E., He, F., Yang, L., & Yin, F. (2020). Intellectual Disability and Potassium Channelopathies: A Systematic Review. *Frontiers in Genetics*, 11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00614>
- Kim J. B. (2014). Channelopathies. *Korean journal of pediatrics*, 57(1), 1–18. <https://doi.org/10.3345/kjp.2014.57.1.1>
- Kim, F. J., & Maher, C. M. (2017). Sigma1 Pharmacology in the Context of Cancer. *Handbook of experimental pharmacology*, 244, 237–308. [https://doi.org/10.1007/164\\_2017\\_38](https://doi.org/10.1007/164_2017_38)
- Kinoshita, M., Matsuoka, Y., Suzuki, T., Mirrielees, J., & Yang, J. (2012). Sigma-1 receptor alters the kinetics of Kv1.3 voltage gated potassium channels but not the sensitivity to receptor ligands. *Brain research*, 1452, 1-9.
- Kinoshita, M., Matsuoka, Y., Suzuki, T., Mirrielees, J., & Yang, J. (2012). Sigma-1 receptor alters the kinetics of Kv1.3 voltage gated potassium channels but not the sensitivity to receptor ligands. *Brain research*, 1452, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.02.070>
- Kortüm, F., Caputo, V., Bauer, C. K., Stella, L., Ciolfi, A., Alawi, M., Bocchinfuso, G., Flex, E., Paolacci, S., Dentici, M. L., Grammatico, P., Korenke, G. C., Leuzzi, V., Mowat, D., Nair, L. D., Nguyen, T. T., Thierry, P., White, S. M., Dallapiccola, B., Pizzuti, A., ... Kutsche, K. (2015). Mutations in *KCNH1* and *ATP6V1B2* cause Zimmermann-Laband syndrome. *Nature genetics*, 47(6), 661–667. <https://doi.org/10.1038/ng.3282>
- Kortüm, F., Caputo, V., Bauer, C. K., Stella, L., Ciolfi, A., Alawi, M., Bocchinfuso, G., Flex, E., Paolacci, S., Dentici, M. L., Grammatico, P., Korenke, G. C., Leuzzi, V., Mowat, D., Nair, L. D., Nguyen, T. T., Thierry, P., White, S. M., Dallapiccola, B., Pizzuti, A., Campeau, P. M., Tartaglia, M., Kutsche, K. (2015). Mutations in *KCNH1* and *ATP6V1B2* cause Zimmermann-Laband syndrome. *Nature genetics*, 47(6), 661-667. <https://doi.org/10.1038/ng.3282>
- Lampert, A., O'Reilly, A. O., Reeh, P., & Leffler, A. (2010). Sodium channelopathies and pain. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 460(2), 249–263. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0779-3>
- Lipscombe, D., & Toro, C. P. (2014). Biophysics of Voltage-Gated Ion Channels. *From Molecules to Networks*, 377–407. doi:10.1016/b978-0-12-397179-1.00013-0
- Litan, A., & Langhans, S. A. (2015). Cancer as a channelopathy: ion channels and pumps in tumor development and progression. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00086>
- Liu X., Fu Y., Yang H., Mavlyutov T., Li J., McCurdy C. R., Guo L., Pattnaik B. R. (2017) Potential independent action of sigma receptor ligands through inhibition of the Kv2.1 channel. *Oncotarget*. 8: 59345-59358. Retrieved from <https://www.oncotarget.com/article/19581/text/>
- Liu, D., Tseng, M., Epstein, L. F., Green, L., Chan, B., Soriano, B., Lim, D., Pan, O., Murawsky, C. M., King, C. T., & Moyer, B. D. (2016). Evaluation of recombinant monoclonal antibody SVmab1 binding to Na<sub>v</sub>1.7 target sequences and block of human Na<sub>v</sub>1.7 currents. *F1000Research*, 5, 2764. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9918>.
- Liu, J., Tan, H., Yang, W., Yao, S., & Hong, L. (2019). The voltage-gated sodium channel Na<sub>v</sub>1.7 associated with endometrial cancer. *Journal of Cancer*, 10(20), 4954–4960. <https://doi.org/10.7150/jca.31544>
- Liu, Z., Zhang, J., Gao, Y., Pei, L., Zhou, J., Gu, L., Zhang, L., Zhu, B., Hattori, N., Ji, J., Yuasa, Y., Kim, W., Ushijima, T., Shi, H., & Deng, D. (2014). Large-scale characterization of DNA methylation changes in human gastric carcinomas with and without metastasis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 20(17), 4598–4612. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3380>
- Loza-Huerta, A.; Milo, E.; Picones, A.; Hernández-Cruz, A.; Luis, E. (2021). Thallium-Sensitive Fluorescent Assay Reveals Loperamide as a New Inhibitor of the Potassium Channel Kv10.1. *Pharmacology*, 73, 1744–1753
- 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>

- Martin, S., De Oliveira, C. L., De Queiroz, F. M., Pardo, L. A., Stühmer, W., & Del Bel, E. (2008). Eag1 potassium channel immunohistochemistry in the CNS of adult rat and selected regions of human brain. *Neuroscience*, 155(3), 833-844. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.05.019>
- Matsuno, K., Nakazawa, M., Okamoto, K., Kawashima, Y., & Mita, S. (1996). Binding properties of SA4503, a novel and selective sigma 1 receptor agonist. *European journal of pharmacology*, 306(1-3), 271–279. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(96\)00201-4](https://doi.org/10.1016/0014-2999(96)00201-4)
- Mattei C. (2018). Tetrodotoxin, a Candidate Drug for Nav1.1-Induced Mechanical Pain?. *Marine drugs*, 16(2), 72. <https://doi.org/10.3390/md16020072>
- Maurice, T., & Su, T.-P. (2009). The pharmacology of sigma-1 receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, 124(2), 195–206. doi: 10.1016/j.pharmthera.2009.07.001
- Medina, E. y Luis, E. (2022). Nav1.7: un prometedor blanco para el tratamiento del dolor. *Revista Peruana de Divulgación Científica en Genética y Biología Molecular [en línea]*. Lima: Editorial IGBM, 2022(2): 48–54. ISSN: 2415–234X. Disponible en: <http://igbmgenetica.com/revista-rdgbm/>
- Megalizzi V, Mathieu V, Mijatovicz T, Gailly P, Debeir O, De Nevez N et al (2007) 4-IBP, a  $\sigma_1$  receptor agonist, decreases the migration of human cancer cells, including glioblastoma cells, in vitro and sensitizes them in vitro and in vivo to cytotoxic insults of proapoptotic and proautophagic drugs. *Neoplasia* 9:358–369
- Menéndez, J. T. (2004). Los poros y los canales iónicos regulan la actividad celular. In *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* (Vol. 70, No. 1).
- Morales-Lázaro, S. L., González-Ramírez, R., & Rosenbaum, T. (2019). Molecular Interplay Between the Sigma-1 Receptor, Steroids, and Ion Channels. *Frontiers in Pharmacology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00419>
- Morán-Zendejas, R., & Rodríguez-Menchaca, A. A. (2023). The anti-tumor drug 2-hydroxyoleic acid regulates the oncogenic potassium channel Kv10.1. *Beni-Suef University Journal Of Basic And Applied Sciences*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s43088-023-00354-z>
- Mortimer, J. T., & Bhadra, N. (2009). Fundamentals of Electrical Stimulation. *Neuromodulation*, 109–121. doi:10.1016/b978-0-12-374248-3.00012-4
- Ortíz-Rentería, M., Juárez-Contreras, R., González-Ramírez, R., Islas, L. D., Sierra-Ramírez, F., Llorente, I., Simon, S. A., Hiriart, M., Rosenbaum, T., & Morales-Lázaro, S. L. (2018). TRPV1 channels and the progesterone receptor Sig-1R interact to regulate pain. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 115(7). <https://doi.org/10.1073/pnas.1715972115>
- Ouadid, H., Ahidouch, A., & Pardo, L. A. (2016). Kv10.1 K<sup>+</sup> channel: from physiology to cancer. In *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* (Vol. 468, Issue 5, pp. 751–762). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00424-015-1784-3>
- Pardo, L. A., Contreras-Jurado, C., Zientkowska, M., Alves, F., & Stühmer, W. (2005). Role of Voltage-gated Potassium Channels in Cancer. *Journal of Membrane Biology*, 205(3), 115–124. doi:10.1007/s00232-005-0776-1
- Nuvia, P. C., Del Carmen, M. T. M., & Ivette, D. M. (s. f.). Canalopatías, un novedoso enfoque en la fisiopatología del dolor. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S003475312017000300011&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003475312017000300011&lng=es&tlng=es).
- Peruzzo, R., Biasutto, L., Szabò, I., & Leanza, L. (2016). Impact of intracellular ion channels on cancer development and progression. *European biophysics journal : EBJ*, 45(7), 685–707. <https://doi.org/10.1007/s00249-016-1143-0>
- Pijuan J, Barceló C, Moreno DF, Maiques O, Sisó P, Marti RM, Macià A and Panosa A (2019) In vitro Cell Migration, Invasion, and Adhesion Assays: From Cell Imaging to Data Analysis. *Front. Cell Dev. Biol.* 7:107. doi: 10.3389/fcell.2019.00107
- Prevarskaya, N., Skryma, R., & Shuba, Y. (2018). Ion Channels in Cancer: Are Cancer Hallmarks Oncochannelopathies?. *Physiological reviews*, 98(2), 559–621. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2016>
- Purves, D., Augustine, G. J., & Fitzpatrick, D. (2018). *Neuroscience*, 6o Edition, Sinauer Associates.

- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Katz, L. C., LaMantia, A.-S., McNamara, J. O., & Mark Williams. (2013). Voltage-Gated Ion Channels. Nih.gov; Sinauer Associates. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10883/>
- Ranjan, R., Logette, E., Marani, M., Herzog, M., Tâche, V., Scantamburlo, E., ... & Markram, H. (2019). A kinetic map of the homomeric voltage-gated potassium channel (Kv) family. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 358.
- Robinson, T. S., & Osman, M. A. (2023). An Emerging Role for Sigma Receptor 1 in Personalized Treatment of Breast Cancer. *Cancers*, 15(13), 3464. <https://doi.org/10.3390/cancers15133464>
- Roh, D. H., & Yoon, S. (2014). Sigma-1 Receptor Antagonist, BD1047 Reduces Nociceptive Responses and Phosphorylation of p38 MAPK in Mice Orofacial Formalin Model. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 37(1), 145-151. <https://doi.org/10.1248/bpb.b13-00690>
- Rojas-Sánchez, G., García-Miranda, A., Montes-Alvarado, J. B., Cotzomi-Ortega, I., Sarmiento-Salinas, F. L., Jimenez-Ignacio, E. E., Ramírez-Ramírez, D., Romo-Rodríguez, R., Reyes-Leyva, J., Vallejo-Ruíz, V., Pazos-Salazar, N. G., & Maycotte, P. (2021). Chloroquine Induces ROS-mediated Macrophage Migration Inhibitory Factor Secretion and Epithelial to Mesenchymal Transition in ER-positive Breast Cancer Cell Lines. *Journal Of Mammary Gland Biology And Neoplasia*, 26(4), 341-355. <https://doi.org/10.1007/s10911-021-09503-5>
- Rosas, M. M. (2004). Los canales iónicos: la biología y patología. *Archivos de cardiología de México*, 74(s2), 205-210.
- Rosendo, M. J., Moreno, C. M., & Vaca, L. (2020). Role of ion channels during cell division. *Cell Calcium*, 91, 102258.
- Ruiz-Cantero, M. C., González-Cano, R., Tejada, M. A., Santos-Caballero, M., Perazzoli, G., Nieto, F. R., & Cobos, E. J. (2020). SIGMA-1 RECEPTOR: A DRUG TARGET FOR THE MODULATION OF NEUROIMMUNE AND NEUROGLIAL INTERACTIONS DURING CHRONIC PAIN. *Pharmacological Research*, 105339. doi:10.1016/j.phrs.2020.105339
- Ryskamp, D. A., Korban, S., Zhemkov, V., Kraskovskaya, N., & Bezprozvanny, I. (2019). Neuronal Sigma-1 Receptors: Signaling Functions and Protective Roles in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Neuroscience*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2019.00862>
- Salaciak, K., & Pytka, K. (2022). Revisiting the sigma-1 receptor as a biological target to treat affective and cognitive disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 132, 1114–1136. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.10.037>
- Sánchez-Fernández, C., Entrena, J. M., Baeyens, J. M., & Cobos, E. J. (2017). Sigma-1 Receptor Antagonists: A New Class of Neuromodulatory Analgesics. En *Advances in experimental medicine and biology* (pp. 109-132). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-50174-1\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-50174-1_9)
- Schmidt, H. R., & Kruse, A. C. (2019). The Molecular Function of  $\sigma$  Receptors: Past, Present, and Future. *Trends in Pharmacological Sciences*, 40(9), 636–654. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.07.006>
- Schmidt, H. R., Zheng, S., Gurpinar, E., Koehl, A., Manglik, A., & Kruse, A. C. (2016). Crystal structure of the human  $\sigma_1$  receptor. *Nature*, 532(7600), 527-530. <https://doi.org/10.1038/nature17391>
- Scholz, A. (2007). Nav1.7 Voltage - Gated Sodium Channel. *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/b978-008055232-3.60413-1>
- Senda, T., Matsuno, K., Okamoto, K., Kobayashi, T., Nakata, K., & Mita, S. (1996). Ameliorating effect of SA4503, a novel  $\sigma_1$  receptor agonist, on memory impairments induced by cholinergic dysfunction in rats. *European Journal of Pharmacology*, 315(1), 1–10. doi:10.1016/s0014-2999(96)00572-9
- Simons, C., Rash, L. D., Crawford, J., Ma, L., Cristofori-Armstrong, B., Miller, D., Ru, K., Baillie, G. J., Alanay, Y., Jacquinet, A., Debray, F. G., Verloes, A., Shen, J., Yesil, G., Guler, S., Yuksel, A., Cleary, J. G., Grimmond, S. M., McGaughran, J., King, G. F., ... Taft, R. J. (2015). Mutations in the voltage-gated potassium channel gene KCNH1 cause Temple-Baraitser syndrome and epilepsy. *Nature genetics*, 47(1), 73–77. <https://doi.org/10.1038/ng.3153>
- Soriani, O., & Kourrich, S. (2019). The Sigma-1 Receptor: When Adaptive Regulation of Cell Electrical Activity Contributes to Stimulant Addiction and Cancer. *Frontiers In Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01186>

- Srivats, S., Balasuriya, D., Pasche, M., Vistal, G., Edwardson, J. M., Taylor, C. W., & Murrell-Lagnado, R. D. (2016). Sigma1 receptors inhibit store-operated Ca<sup>2+</sup> entry by attenuating coupling of STIM1 to Orai1. *Journal of Cell Biology*, 213(1), 65-79.
- Stansfeld, C. E., Röper, J., Ludwig, J., Weseloh, R. M., Marsh, S. J., Brown, D. A., & Pongs, O. (1996). Elevation of intracellular calcium by muscarinic receptor activation induces a block of voltage-activated rat ether-a-go-go channels in a stably transfected cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(18), 9910-9914. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9910>
- Sultan, S., Fisher, D. A., Voils, C. I., Kinney, A. Y., Sandler, R. S., & Provenzale, D. (2004). Impact of functional support on health-related quality of life in patients with colorectal cancer. *Cancer*, 101(12), 2737–2743. <https://doi.org/10.1002/cncr.20699>
- Tesei, A., Cortesi, M., Zamagni, A., Arienti, C., Pignatta, S., Zanoni, M., Paolillo, M., Curti, D., Rui, M., Rossi, D., & Collina, S. (2018). Sigma Receptors as Endoplasmic Reticulum Stress "Gatekeepers" and their Modulators as Emerging New Weapons in the Fight Against Cancer. *Frontiers in pharmacology*, 9, 711. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00711>
- Ufartes, R., Schneider, T., Mortensen, L. S., De Juan Romero, C., Hentrich, K., Knoetgen, H., Beilinson, V., Moebius, W., Tarabykin, V., Alves, F., Pardo, L. A., Rawlins, J. N. P., & Stuehmer, W. (2013). Behavioural and functional characterization of Kv10.1 (Eag1) knockout mice. *Human Molecular Genetics*, 22(11), 2247-2262. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt076>
- Urrego D, Tomczak AP, Zahed F, Stü'hmer W, Pardo LA. (2014) Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Phil. Trans. R. Soc. B* 369: 20130094.
- Valdés-Abadía, B., Morán-Zendejas, R., Rangel-Flores, J. M., & Rodríguez-Menchaca, A. A. (2019). Chloroquine inhibits tumor-related Kv10.1 channel and decreases migration of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro. *European Journal Of Pharmacology*, 855, 262-266. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.05.017>
- Vetter, I., Deuis, J. R., Mueller, A., Israel, M. R., Starobova, H., Zhang, A., Rash, L. D., & Mobli, M. (2017). Nav1.7 as a pain target – From gene to pharmacology. *Pharmacology & Therapeutics*, 172, 73–100. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.11.015>
- Vilner, B. Y., De Costa, B., & Bowen, W. D. (1995). Cytotoxic effects of sigma ligands: sigma receptor-mediated alterations in cellular morphology and viability. *The Journal Of Neuroscience*, 15(1), 117-134. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.15-01-00117.1995>
- Yang, J., Antin, P., Berx, G., Blanpain, C., Brabletz, T., Bronner, M., Campbell, K., Cano, A., Casanova, J., Christofori, G., Dedhar, S., Derynck, R., Ford, H. L., Fuxe, J., García de Herreros, A., Goodall, G. J., Hadjantonakis, A. K., Huang, R. J. Y., Kalcheim, C., ... Sheng, G. (2020). Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 21, Issue 6, pp. 341–352). *Nature Research*. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0237-9>
- Wang, W., & MacKinnon, R. (2017). Cryo-EM Structure of the Open Human Ether-à-go-go-Related K<sup>+</sup> Channel hERG. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.048>
- Wang, X., Chen, Y., Zhang, Y. et al. (2017) Eag1 Voltage-Dependent Potassium Channels: Structure, Electrophysiological Characteristics, and Function in Cancer. *J Membrane Biol* 250, 123–132. <https://doi.org/10.1007/s00232-016-9944-8>
- Wang, Y., Mi, J., Lu, K., Lu, Y., & Wang, K. (2015). Comparison of Gating Properties and Use-Dependent Block of Nav1.5 and Nav1.7 Channels by Anti-Arrhythmics Mexiletine and Lidocaine. *PloS one*, 10(6), e0128653. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128653>
- Whicher, J. R., & MacKinnon, R. (2016). Structure of the voltage-gated K<sup>+</sup> channel Eag1 reveals an alternative voltage sensing mechanism. *Science*, 353(6300), 664-669. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8070>
- Xia, J., Huang, N., Huang, H., Sun, L., Dong, S., Su, J., ... Liao, W. (2016). Voltage-gated sodium channel Nav1.7 promotes gastric cancer progression through MACC1-mediated upregulation of NHE1. *International Journal of Cancer*, 139(11), 2553–2569. doi:10.1002/ijc.30381
- Zhang, H., & Cuevas, J. (2005).  $\sigma$  Receptor activation blocks potassium channels and depresses neuroexcitability in rat intracardiac neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 313(3), 1387-1396.