



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estudio farmacológico y electrofisiológico del canal
iónico de potasio dependiente de voltaje Kv10.1**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

EDGAR GERARDO MILO ROCHA



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

Ciudad universitaria, Cd. MX., 2019



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.



Financiado por CONACYT: Laboratorios Nacionales Consolidación II

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Apellido paterno	Milo
Apellido Materno	Rocha
Nombre(s)	Edgar Gerardo
Teléfono	55 44 63 87 82
Universidad Nacional Autónoma de México	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de ciencias	Facultad de ciencias
Carrera	Biología
Número de cuenta	312253796

2. Datos del tutor

Grado	Dr.
Nombre(s)	Enoch
Apellido paterno	Luis
Apellido materno	Baltazar

3. Datos del sinodal 1

Grado	Dr.
Nombre(s)	Arturo
Apellido paterno	Hernández
Apellido materno	Cruz

4. Datos del sinodal 2

Grado	Dr.
Nombre(s)	Pedro David
Apellido paterno	Segura
Apellido materno	Chama

5. Datos del sinodal 3

Grado	Dr.
Nombre(s)	Arturo
Apellido paterno	Picones
Apellido materno	Medina

6. Datos del sinodal 4

Grado	Fís.
Nombre(s)	César Oliver
Apellido paterno	Lara
Apellido materno	Figueroa

7. Datos del trabajo escrito

Título	Estudio farmacológico y electrofisiológico del canal iónico de potasio dependiente de voltaje Kv10.1
Número de páginas	p45
Año	2019

Agradecimientos

En primer lugar quiero dar mi mayor agradecimiento al Dr. Enoch Luis Baltazar por el apoyo, el tiempo, consejos y por todo lo que he aprendido durante este tiempo en el laboratorio, así como al Fís. César Oliver Figueroa por introducirme y guiarme en esta grandiosa e interesante rama de la biología. Encima de todo, gracias a ustedes por introducirme a la labor científica y contagiarme la gran pasión que tienen por ella.

A los miembros del jurado, Dr. Arturo Hernández Cruz, Dr. Pedro Segura Chama y al Dr. Arturo Picones Medina por sus valiosas revisiones a mi trabajo.

A los miembros del Laboratorio Nacional de Canalopatías (LaNCa): Arleth Loza Huerta por la valiosa ayuda proporcionada durante mi estancia en el laboratorio y a Agustín Flores Gonzales por su apoyo brindado como auxiliar de laboratorio.

A mi madre, Martha Rocha por todos los sacrificios, preocupaciones y palabras de aliento para que cada día pudiera perseguir y cumplir mis objetivos de vida, ya que sin ello no hubiera podido concluir este importante capítulo de mi vida. A mis hermanos, Gerardo y Luis por darme ánimos y confianza que tanto necesité durante mi carrera.

A mis amigos, León, Abelardo, Diana, Mitzi y Zyanya por acompañarme desde el inicio hasta el final de la licenciatura, gracias por todas aquellas veces que me acompañaron y me ayudaron a regresar a mi camino, a superarme cada día y por hacerme siempre la mejor versión de mí, ustedes hicieron que la licenciatura fuera una de las mejores etapas de mi vida.

Este trabajo fue realizado con el apoyo: CONACYT: Laboratorios Nacionales Consolidación II por medio de una beca recibida por la conclusión de estudios de licenciatura.

Índice

Resumen	1
1. Introducción	2
1.1 Generalidades de la estructura celular	2
1.2 Los canales iónicos	2
1.2.1 Los canales iónicos dependientes de voltaje	4
1.2.2 Los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv)	6
1.3 El canal de potasio Kv10.1	8
1.3.1 Propiedades biofísicas y farmacológicas del canal Kv10.1	10
1.3.2 Localización y función	12
1.4. El cáncer como una canalopatía	12
1.4.1 El canal Kv10.1 como blanco farmacológico contra el cáncer.....	13
1.5 Resultados previos en el LaNCa	14
2. Justificación	17
3. Hipótesis	18
4. Objetivos	18
4.1 Objetivo General	18
4.2 Objetivos Particulares	18
5. Metodología	19
5.1 Cultivos Celulares	19
5.2 Registro electrofisiológico.....	19
5.3 Análisis estadístico	21
6. Resultados	23
6.1 Las células HEK-WT no expresan corrientes de K ⁺ endógenas.....	23

6.2 Efecto de Amlodipino, SR 33805 y Loperamida sobre la actividad de los canales Kv10.1.....	24
6.2.1 Efecto del Amlodipino sobre las corrientes Kv10.1	25
6.2.2 Efecto de SR 33805 oxalato sobre las corrientes Kv10.1.....	27
6.2.3 Efecto de la Loperamida sobre las corrientes Kv10.1	28
6.3 Efecto del SR y la Loperamida sobre la inactivación dependiente de voltaje del canal Kv10.1.....	31
7. Discusión	35
8. Conclusiones.....	38
9. Bibliografía.....	40

Resumen

El canal de K⁺ dependiente de voltaje Kv10.1 o Eag1 es un canal iónico que se expresa normalmente en tejido cerebral, testículos, placenta y en las primeras etapas de diferenciación de los mioblastos. Este canal ha sido ampliamente estudiado debido a que se sobreexpresa en aproximadamente el 70% de los tumores de diferentes orígenes. La inhibición farmacológica del canal (usando moléculas pequeñas o anticuerpos) ha mostrado resultados positivos en diferentes modelos experimentales de cáncer, tanto *in vitro* como *in vivo*, pero debido a la baja especificidad de estos compuestos no ha sido posible considerarlos como posibles herramientas terapéuticas contra diferentes tipos de tumores.

En esta tesis, se realizaron experimentos electrofisiológicos para estudiar el efecto de los compuestos Amlodipino, SR 33805 oxalato y Loperamida sobre la actividad del canal Kv10.1. Los resultados mostraron que dichos compuestos tenían propiedades inhibitorias sobre la actividad del canal Kv10.1, y que los efectos eran dependientes de la concentración. Además del efecto inhibitorio, se observó que los compuestos SR 33805 oxalato y Loperamida aceleraban la inactivación dependiente de voltaje del canal. La Loperamida, un agonista del receptor opioide Mu (μ), usado en la clínica como un antidiarreico, produjo el mayor efecto inhibitorio en comparación con el efecto del SR 33805 y Amlodipino; además, de bloquear al Kv10.1, la Loperamida ha sido descrita como un inhibidor de canales de sodio y de calcio dependientes de voltaje, esto sugiere que podrían existir regiones estructuralmente conservadas de ellos a los cuales la Loperamida se una. Dado que el mecanismo de acción a través del cual los compuestos ensayados ejercen sus efectos parece ser muy diferentes, esto abre la puerta a nuevas preguntas sobre la biofísica del canal Kv10.1.

En resumen, podemos concluir que los resultados electrofisiológicos mostraron una correlación positiva con los datos obtenidos previamente mediante ensayos de fluorescencia. Así que el uso de ambas metodologías puede acelerar la búsqueda de compuestos con acción sobre el canal Kv10.1.

1. Introducción

1.1 Generalidades de la estructura celular

La membrana plasmática de las células eucariotas está conformada por una bicapa de fosfolípidos (hidrofóbica) y proteínas, que funciona como una barrera física semipermeable entre el citosol y el medio extracelular. Algunas de sus funciones principales son: 1) limitar y proteger a las células, 2) facilitar el transporte de nutrientes, metabolitos e iones necesarios para la homeostasis celular a través de estructuras proteicas que la atraviesan y 3) permitir que las células se reconozcan y comuniquen entre sí (Karp, 2015).

Entre todos los componentes de la membrana plasmática, las proteínas de membrana juegan un papel importante en la homeostasis celular, realizando tareas específicas y dando a cada tipo celular características funcionales propias. Las proteínas de membrana pueden agruparse en dos clases principales: 1) las proteínas integrales de membrana, que se caracterizan por estar embebidas completamente en la membrana celular y por tener dominios a cada lado de esta, y 2) las proteínas periféricas, las cuales se encuentran unidas en una de las dos caras de la membrana plasmática mediante enlaces no covalentes (Alberts et al, 2015).

Para el correcto funcionamiento de las células, estas requieren contar con mecanismos que faciliten el movimiento de nutrientes, metabolitos e iones hacia el interior o hacia el exterior celular. Esto se lleva a cabo por un conjunto especializado de proteínas que funcionan como transportadores. Estos transportadores son clasificados en dos grandes grupos: los canales iónicos y los acarreadores.

1.2 Los canales iónicos

Los canales iónicos son proteínas integrales de las membranas celulares, es decir, son estructuras que atraviesa completamente la membrana plasmática y forman un poro semipermeable entre el citosol y el espacio extracelular (Alberts et al, 2015). Estas proteínas se abren, bien por la unión específica de ligando, bien por

cambios de voltaje en la membrana (Hille, 2001). Cuando estos canales se encuentran abiertos permiten el flujo o difusión de iones, los cuales se mueven siguiendo su gradiente electroquímico. La transición entre el estado cerrado y abierto del canal involucra un cambio conformacional de la proteína, lo cual se conoce como mecanismo de apertura (*gating*). Estos cambios conformacionales entre el estado cerrado al abierto (y viceversa) ocurren en cuestión de milisegundos. Durante los pocos milisegundos que el canal está abierto pueden moverse alrededor de 10^7 - 10^8 iones por segundo. Los canales iónicos se encuentran en todas las membranas celulares y son importantes en procesos fisiológicos tan diversos como la excitación muscular y nerviosa, la secreción hormonal, la transducción sensorial, el aprendizaje y la memoria, el crecimiento celular, el balance hídrico y la homeostasis salina y la regulación de la presión sanguínea. El funcionamiento anómalo de algunos canales iónicos se asocia a graves patologías conocidas como canalopatías, como por ejemplo el síndrome de QT largo (LQTS, por sus siglas en inglés) o la fibrosis quística (Moss & Kass, 2005).

En las células, se encuentran otras proteínas de membrana conocidas como acarreadores (también llamados transportadores). Estos acarreadores enlazan iones específicos, a los cuales pueden transferir hacia el interior o exterior de la célula (Alberts et al, 2015). El proceso de fijación y liberación de iones, en comparación a los canales iónicos, es lento y requiere varios milisegundos. El propósito primario de los transportadores es generar gradientes de concentración transmembrana, los cuales son explotados luego por los canales iónicos para la generación de señales eléctricas (Purves et al, 2015).

A nivel estructural, los canales iónicos son muy diversos, aunque comparten características comunes: todos son proteínas integrales de membrana, un canal funcional está formado por el acople de varias subunidades o dominios, todos forman un poro por donde los iones se mueven y estos pueden ser activados (abiertos) por estímulos muy específicos (eléctricos, químicos o físicos). Los canales iónicos se pueden clasificar en dos grupos principales: 1) canales iónicos

dependientes de voltaje, los cuales son activados por cambios en el potencial de membrana de la célula y tienen una selectividad preferencial por alguno los principales iones fisiológicos (Na^+ , K^+ , Cl^- y Ca^{2+}) (Fig.1) y 2) canales iónicos activados por ligando, los cuales son activados por la unión de una molécula específica (ligando) en la cara externa o interior del canal, la mayoría de estos canales muestran poca selectividad iónica, permitiendo el movimiento de diferentes iones a la vez y a diferencia de los canales abiertos por voltaje suelen ser menos activos, donde su función principal es convertir las señales químicas en eléctricas, ejemplo de estos son los canales ionotrópicos activados por neurotransmisores (glutamato, GABA, serotonina, etc) (Purves et al, 2015).

1.2.1 Los canales iónicos dependientes de voltaje

El conocimiento de los canales iónicos sensibles a voltaje comenzó con los experimentos clásicos hechos por Alan Hodgkin y Andrew Huxley (a finales de la década de 1940) mediante la técnica de fijación de voltaje (*voltage-clamp*). El modelo experimental que ellos eligieron fue el axón gigante del calamar debido a su tamaño (>1 mm de diámetro), lo que permitía la inserción de electrodos para la fijación de voltaje. Ellos fueron los primeros en proponer que los potenciales de acción en el calamar eran generados por cambios en la permeabilidad de Na^+ y K^+ , y que dichos cambios en la permeabilidad eran sensibles al potencial de membrana neuronal. Aunque ellos no conocían los mecanismos moleculares (canales) que originaban el potencial de acción, ellos propusieron que en la membrana del axón existían compuertas que permitían el flujo selectivo de iones hacia uno u otro lado de la membrana (Purves et al, 2015).

La primera evidencia experimental acerca de la presencia de canales iónicos sensibles al voltaje en la membrana de neuronas llegó con la medición de corrientes iónicas moviéndose a través de un solo canal. El estudio de corrientes unitarias producidas por un solo canal mostró que en el axón gigante de calamar existían al menos dos tipos de canales, uno permeable a Na^+ y otro a K^+ . Ambos tipos de canales eran sensibles al voltaje, es decir que su actividad era

influenciada por el potencial de membrana de la neurona; en ambos casos, la depolarización del potencial de membrana incrementaba la probabilidad de apertura de los canales, mientras que la hiperpolarización disminuía dicha probabilidad (Bear et al, 2016)

Finalmente, gracias al avance en técnicas bioquímicas y de biología molecular permitieron conocer la secuencia de aminoácidos y la estructura de los canales iónicos. Hasta la fecha, una diversidad de genes que codifican para canales iónicos han sido clonados y secuenciados, la mayoría de ellos permeables a los iones de relevancia fisiológica (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} y Cl^-). Posteriormente, con la ayuda de métodos computacionales fue posible crear modelos estructurales de los canales y de describir sitios probables de unión de agonistas y antagonistas de ellos. Con el uso de herramientas de biología molecular fue posible identificar los genes que codificaban para canales iónicos y poder hacer que estos se expresaran en sistemas de expresión heterólogos, por ejemplo líneas celulares de mamífero (células HEK293 o CHO), lo que permitió estudiar y describir las propiedades biofísicas y farmacológicas de diversos canales en un sistema en el que de forma nativa no suelen expresarse canales iónicos (Potter, Tapper, & George, 2003).

Todos los canales iónicos dependientes de voltaje tienen una estructura similar: un dominio o subunidad que se compone de 6 segmentos transmembrana (S1-S6). El segmento S5 y S6 está conectado por un asa-P la cual forma el poro y el filtro de selectividad del canal. Los canales iónicos que son sensibles al voltaje tienen un dominio sensor de voltaje (S1-S4) que puede sentir los cambios en el voltaje de membrana, lo que produce un cambio conformacional de la proteína, lo cual se refleja en la apertura del canal. Los canales iónicos tienen 2 o más estados conformacionales, los cuales representan estados funcionales. Los canales iónicos dependientes de voltaje generalmente oscilan entre los estados abierto (estado conductor) y cerrado (estado no conductor). Algunos canales se alejan de estos dos estados conformacionales, por ejemplo los canales de sodio que oscilan

al menos en tres estados conformacionales (abierto, cerrado e inactivado) (Purves, 2015).

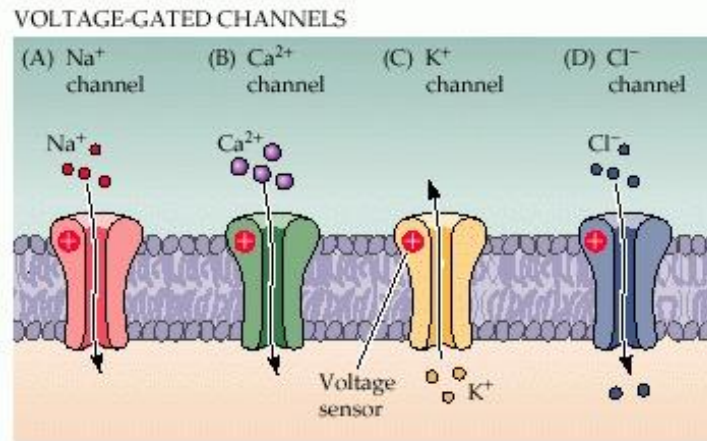


Figura 1. **Esquema de los principales canales iónicos dependientes de voltaje.** Los canales iónicos dependientes de voltaje son proteínas integrales de membrana que forman poros selectivos para alguno de los iones fisiológicos. (Tomado de Purves et al, 2015).

1.2.2 Los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv)

Los canales de potasio conforman a la familia más grande y diversa de canales iónicos. Estos son definidos por facilitar el movimiento selectivo de K⁺ (siguiendo su gradiente electroquímico) a través de la membrana celular. Hasta la fecha, se conocen 77 genes que codifican para canales de K⁺, los cuales pueden ser clasificados en base al estímulo al cual responden (por voltaje o por ligando), a sus propiedades de conducción (rectificadores de entrada o de salida) y a su estructura. Usando una combinación de estas tres propiedades los canales de K⁺ se agrupan en 4 clases: 1) los canales de K⁺ dependientes de voltaje (Kv), 2) los canales de potasio activados por Ca²⁺ (K_{Ca}), los canales de potasio rectificadores de entrada (K_{ir}) y los canales de K⁺ con dos dominios de poro (K2P) (Pardo & Stühmer, 2015). Los genes que codifican para canales de K⁺ se han agrupado en las familias: KCNA, KCNB, KCNC, KCND, KCNF, KCNG, KCNH, KCNJ, KCNK, KCNM, KCNN, KCNQ, KCNS, KCNT, KCNU y KCNV.

Los canales Kv a su vez son subclasificados en 12 subfamilias (Kv1-12). Un canal Kv funcional es formado por el ensamble de 4 subunidades idénticas (tetrámero). La estructura típica de cada subunidad Kv está bastante conservada, cada subunidad contiene 6 segmentos transmembranales (S1-S6), donde los primeros 4 segmentos (S1-S4) forman el dominio sensor del voltaje (DSV) y los segmentos S5 al S6 forman el dominio formador del poro. Además, entre el S5 y S6 existe una estructura conocida como el asa-P (*P-loop*) la cual contiene una secuencia de aminoácidos TVGYG que determina la selectividad del poro a los iones K^+ (Fig. 2) (Bezanilla, 2008; Heginbotham, Lu, Abramson, & MacKinnon, 1994). En el DSV, el segmento S4 posee aminoácidos cargados positivamente (lisina y arginina) que hacen que los canales Kv sean sensibles al voltaje de membrana.

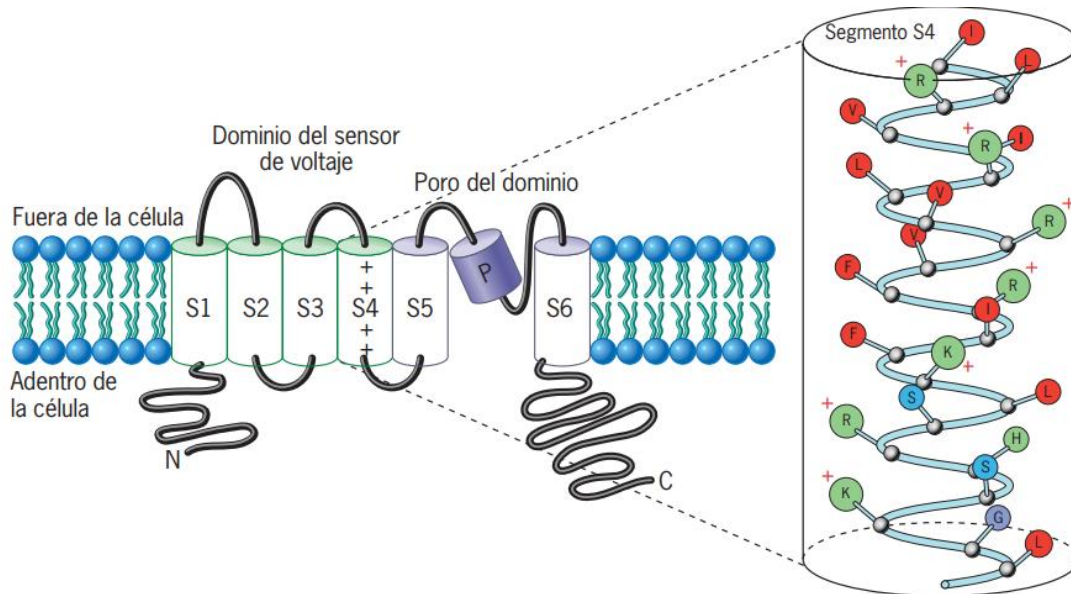


Figura 2. Representación de un canal de K^+ activado por voltaje. Imagen de una subunidad del canal K^+ que muestra sus 6 segmentos transmembranales. A la derecha se ilustra la secuencia de aminoácidos de la hélice S4 del canal de potasio Shaker de *D. melanogaster* que contiene siete cadenas laterales con carga positiva que sirven como sensor de voltaje (tomado de Karp, 2015).

El potencial de reposo de la mayoría de las células de mamíferos es negativo, sin embargo, cuando este potencial se vuelve más positivo (depolarizado) los sensores de voltaje impulsados por el segmento S4 con carga positiva producen

un cambio conformacional del canal, lo que en última instancia genera la apertura del canal (Hille, 2001).

1.3 El canal de potasio Kv10.1

Una de las funciones principales de los canales de K^+ es el de mantener el potencial de reposos negativo y por lo tanto regular la excitabilidad celular. Entonces, no fue extraño que el canal Kv10.1 fuera identificado por primera vez en una mutante de la mosca *Drosophila melanogaster*, la cuales presentaba un fenotipo de hiperexcitabilidad (movimiento rítmico de las patas) al ser anestesiadas con éter (Kaplan, 1969).

El canal de K^+ dependiente de voltaje Kv10.1 o Eag1 (ether-á-go-go, por sus siglas en inglés) es el miembro fundador de la familia KCNH. De acuerdo con la *International Union of Basic and Clinical Pharmacology* (IUPHAR), la familia KCNH comprende 8 miembros organizados en 3 grupos: 1) **EAG** (*Ether-a-go-gó*) a la cual pertenecen los canales Kv10.1 y su isoforma Kv10.2, 2) **ERG** (*Eag-related-gene*) cuyos miembros son el Kv11.1, Kv11.2 y Kv11.3, y 3) **ELK** (*Eag-like K^+*) cuyos representantes son los canales Kv12.1, Kv12.2 y Kv12.3 (Catteral et al, 2002) (Fig. 3). En humanos, el canal Kv10.1 es codificado por el gen KCNH1, el cual está localizado en el cromosoma 1q32.1-32.3. La proteína codificada por el gen KCNH1 consiste de 962 aminoácidos con un peso de 108 KDa (Occhiodoro et al, 1998). Al igual que otros canales Kv, un canal de Kv10.1 funcional está formado por el ensamble de 4 subunidades idénticas, acomodados simétricamente. Cada subunidad Kv10.1 consiste de 6 segmentos (S1-S6) hélices transmembranales, conectados con 3 bucles extracelulares y dos intracelulares. Los segmentos S1-S4 son parte del dominio sensor de voltaje (Fig. 4) (Beuer & Schwarz, 2001).

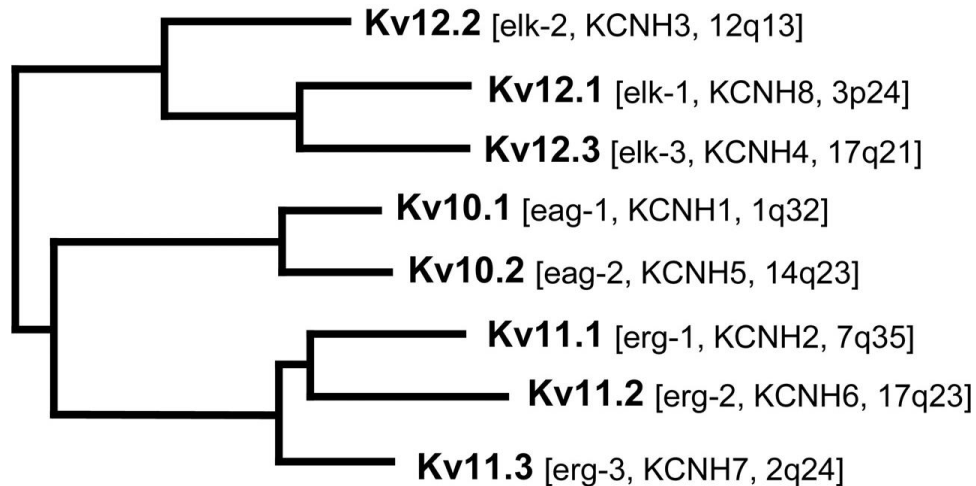


Figura 3. Árbol filogenético de los miembros que codifica el gen KCNH.
 Figura tomada de Catterall et al, 2002.

Un avance relevante sobre la estructura del canal vino del trabajo publicado en 2016 por Whicher y MacKinnon. En este trabajo, se describe por primera vez la estructura del canal Kv10.1 de rata mediante crio-microscopía electrónica (Cryo-EM, por sus siglas en inglés). La estructura en general fue muy parecida a lo ya descrito en otros canales Kv, sin embargo, este trabajo reveló algunas características no descritas antes para esta familia de canales, por ejemplo se observó que el canal tiene una torreta de 40 aminoácidos (de los residuos 378 al 417) entre el S5 y el asa-P la cual rodea la boca externa del poro. Además, en esta torreta hay dos sitios de glicosilación (N388 y N406), los cuales se piensa que forman una barrera que previene la unión de toxinas de origen animal (Whicher & MacKinnon, 2016). También se observó que en el segmento S4, encargado de sentir el voltaje, hay 5 aminoácidos cargados positivamente que son equivalentes a los vistos en el Kv1.2-2.1. Algo que lo distingue de otros canales Kv son sus extremos C- y N- terminal y los cuales contienen varios dominios funcionales, que parecen estar involucrados en la modulación de la actividad del canal. En el extremo N- terminal existe un dominio PAS (Per-Arnt-Sim) y un dominio PAC (PAS asociado con el C- terminal). El dominio PAS se ha propuesto como un dominio sensor de respuestas intracelulares, en el Kv10.1 parece tener un rol en el movimiento de apertura del canal. El canal cuenta con dos dominios de unión a

calmodulina (CaMBD), uno en el extremo N- terminal y dos en el lado C- terminal (McIntosh et al, 2010). En el extremo C- terminal (Fig. 4) hay un dominio de homología de unión a nucleótidos cíclicos (CNBHD) y un enlazador C que acopla el CNBHD al poro, el cual es esencial para el correcto funcionamiento y el tráfico de canales de la familia KCNH (Brelidze et al, 2012). En este extremo se encuentra el “*tetramerizing coiled coil*” (TCC), este dominio es responsable de la correcta tetramerización y estabilidad de este canal (Jenke et al, 2003).

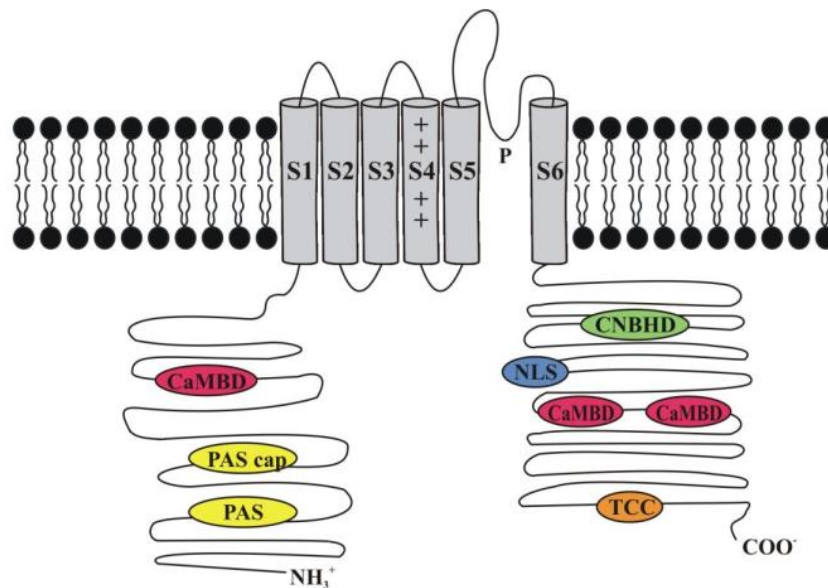


Figura 4. Esquema representativo de una subunidad del canal iónico dependiente de voltaje Kv10.1. Se representan los segmentos transmembranales S1 a S6, entre los segmentos S5 y S6 se encuentra el asa-P. El segmento S4 es considerado como el sensor de voltaje y los segmentos S5 a S6 forman parte del poro, en el extremo N- terminal se encuentran los dominios PAS y un domino CaMBD. Del lado C- terminal se encuentran los dominios CNBHD, TCC y NLS, además de contar con dos dominios CaMBD. Tomado de Urrego-Blanco, 2014.

1.3.1 Propiedades biofísicas y farmacológicas del canal Kv10.1

Además de su estructura, las características electrofisiológicas del Kv10.1 están bien estudiadas. Las corrientes generadas por el canal se activan lentamente y prácticamente no tienen inactivación. La conductancia unitaria del canal varía entre 4.9 a 7.4 pS, dependiendo de la especie en donde se estudie (Wang et al,

2017). El potencial medio de activación ($V_{1/2}$) es de aproximadamente +8.4 mV. La característica más notable de las corrientes Kv10.1, es que la velocidad de activación depende fuertemente del potencial de membrana; cuando el potencial de membrana es fijado a valores muy negativos, la activación de Kv10.1 es más lenta que cuando el potencial de membrana es fijado a valores más positivos, un fenómeno conocido como el movimiento Cole-Moore. La activación más lenta asociada con un potencial de membrana más negativo se puede modelar asumiendo que los canales deben transitar a través de más estados cerrados hasta llegar al estado abierto.

El canal Kv10.1 se modula negativamente por cationes divalentes. Se ha observado que el incremento del ion magnesio (Mg^{2+}) dentro de un rango fisiológicamente relevante reduce la velocidad de activación de Kv10.1 y el $V_{1/2}$ de activación a potenciales más positivos (Kew & Davies, 2010). Este efecto es mimetizado por otros cationes divalentes, por ejemplo, zinc, níquel y calcio. Además, el Ca^{2+} intracelular inhibe al Kv10.1 con una IC_{50} de aproximadamente 100 nM, la inhibición requiere la unión de calmodulina; tres sitios de unión a calmodulina han sido descritos en las regiones N- y C-terminal del canal (Fig. 4) (Schonherr et al, 2000).

En los últimos años, se han descrito compuestos con fuerte actividad inhibitoria sobre el Kv10.1, entre ellos el fármaco antidepresivo tricíclico Imipramina y el antagonista del receptor de histamina H1 Astemizole, los cuales bloquean las corrientes iónicas mediadas por el Kv10.1, con una IC_{50} de ~2 μ M para Imipramina y ~200 nM para Astemizole. Ambos fármacos son bases débiles y sus IC_{50} dependen del pH interno y externo de la célula, lo que sugiere que ambas sustancias atraviesan la membrana en su forma no cargada y actúan desde el interior de la célula en sus formas cargadas (Ferreiro et al, 2004). Sin embargo, estos fármacos no son bloqueadores específicos, el Astemizole tiene afinidad por algunos canales de cloro, algunos miembros de canales de K_{Ca} y por el canal de potasio Kv11.1 el cual tiene un papel importante en la repolarización cardiaca.

1.3.2 Localización y función

A nivel de RNAm, el Kv10.1 se encuentra altamente expresado en cerebro, en placenta, en los testículos, en la glándula adrenal y forma transitoria en mioblastos (Oquadid-Ahidouch et al, 2016). En experimentos hechos en ratones, mediante la técnica de PCR en tiempo real se mostró una alta expresión de Kv10.1 en el bulbo olfatorio, corteza cerebral, hipocampo, hipotálamo y cerebelo (Martin et al, 2008). El Kv10.1 también se localiza en la sinapsis de las fibras paralelas en la corteza cerebral, donde regula la afluencia de Ca^{2+} y la liberación de neurotransmisores durante la actividad repetitiva de alta frecuencia (Mortensen et al, 2014). En el cerebro, el Kv10.1 tiene un papel importante en el control de la excitabilidad neuronal (Han et al, 2017). En los últimos años, se ha observado una sobreexpresión del canal Kv10.1 en aproximadamente el 70% de los tumores benignos y malignos de diferentes orígenes (Hemmerlein, 2006), incluso el canal Kv10.1 está presente y ha sido usado como un potencial biomarcador en estadios tempranos de cáncer (colon, cervical y de seno) y en tumores en fase temprana de desarrollo (glioma, sarcoma, próstata, gástrico) y desarrollados (leucemia mieloide aguda) (Rodríguez-Rasgado, Acuña-Macías, & Camacho, 2012).

1.4. El cáncer como una canalopatía

Las canalopatías son condiciones patológicas asociadas a la presencia de canales iónicos anormales. Las hay en una gran variedad puesto que cada pequeña variación puede causar un trastorno diferente. Las canalopatías pueden resultar del aumento o la pérdida de la función de un canal, y pueden ser tanto adquiridas como heredadas (Kim, 2008).

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo, con 14 millones de casos nuevos y cerca de 8 millones de muertes al año. Desde un punto de vista genético, el cáncer es una enfermedad multifactorial devastadora, que requiere de estrategias terapéuticas diversas. Sin embargo, cuando se analiza fenotípicamente, el cáncer es una enfermedad relativamente uniforme con características comunes que se conservan en una variedad de ellos. Esto sugiere que todos los tumores comparten características moleculares,

bioquímicas o fisiológicas que son independientes de su trasfondo (background) genético. Por lo tanto, es posible que existan mecanismos comunes subyacentes durante su transformación, crecimiento, progresión y metástasis. En años recientes, los canales iónicos presentes en la superficie de las membranas de las células tumorales han surgido entre los nuevos mecanismos involucrados en la biología del cáncer, lo que los convierte en posibles blancos moleculares para el desarrollo de nuevas terapias anticancerígenas. Aunque el cáncer, debido a su complejidad, aún no se concibe como una canalopatía, existe consenso y evidencia de que la expresión anómala de canales iónicos, tanto en la membrana celular como en organelos intracelulares (incluyendo mitocondria, endosomas, lisosomas, núcleo) (Peruzzo et al, 2016) están involucrados en la progresión neoplásica y en la adquisición de un perfil molecular específico de célula tumoral, incluyendo una alta tasa de proliferación, resistencia a la apoptosis, estimulación de angiogénesis, migración e invasividad.

1.4.1 El canal Kv10.1 como blanco farmacológico contra el cáncer

Las propiedades oncogénicas del Kv10.1 fueron descritas por primera vez en el trabajo de Pardo (1999), donde se demuestra que la transfección del canal Kv10.1 en líneas celulares de mamíferos, transformaba el fenotipo normal de esas células hacia un fenotipo tumoral, caracterizado por una alta tasa de proliferación y metabolismo. Además, las células que expresaban el Kv10.1 fueron trasplantadas subcutáneamente en ratones inmunosuprimidos, los cuales en cuestión de 2 a 3 semanas después de la implantación desarrollaron tumores invasivos (Pardo, 1999). Este trabajo fue el primero en mostrar una relación causal entre la expresión de un canal iónico y el desarrollo de tumores. Se ha reportado que el canal Kv10.1 se sobreexpresa en alrededor del 70% de los tumores (Pardo & Stümher, 2015). Trabajos posteriores mostraron que la sobreexpresión del Kv10.1 disminuía las probabilidades de supervivencia de las personas con diversos tipos de cáncer (Pardo & Stümher, 2008). Las evidencias demuestran que la sobreexpresión del canal ofrece ventajas a las células cancerosas, por lo tanto, el buscar compuestos que modulen la expresión del Kv10.1 podrían disminuir o limitar la progresión de los tumores. Al respecto, la inhibición farmacológica del

canal (usando moléculas pequeñas y anticuerpos anti-Kv10.1), tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* (ratones con tumores), mostraron resultados positivos, es decir disminuían muchas propiedades malignas de las células tumorales, como la metástasis, progresión y proliferación de células tumorales (García-Ferreiro et al, 2004). No obstante, los compuestos ensayados tenían poca selectividad, afectando a otros canales iónicos a su vez (entre ellos el Kv11.1, el cual tiene un papel importante en la repolarización cardíaca), por lo que su uso en la clínica prácticamente se descartó.

1.5 Resultados previos en el LaNCa

En el Laboratorio Nacional de Canalopatías (LaNCa), uno de los proyectos de investigación, debido a las propiedades oncogénicas (arriba descritos) del canal Kv10.1, está relacionado con la búsqueda de compuestos que modulen (tanto inhibidores como potenciadores) la actividad del canal, con la finalidad de documentar sus mecanismos de acción sobre las propiedades biofísicas del canal, así como proponer moléculas que puedan posibles candidatos terapéuticos de diferentes tipos de cáncer a los cuales se encuentra asociada la sobreexpresión del Kv10.1. Para la búsqueda más eficiente de dichos compuestos se han realizado en el LaNCa tamizajes primarios de compuestos a través de técnicas de fluorescencia. Usando el kit *FLIPR*® Potassium Assay (Cat. R8222; Molecular Devices) y el lector de multiplacas Flexstation 3 (Molecular Devices) se evaluó indirectamente la actividad del canal Kv10.1 a través del influjo de talio (Tl^+) el cual permeable a través del Kv10.1. Brevemente, las células son incubadas con un indicador fluorescente sensible a Tl^+ , el cual se encuentra unido a un grupo acetometiléster (AM) lo que le permite atravesar la membrana plasmática de las células a través de difusión pasiva, una vez en el citoplasma las esterasas cortan el grupo AM, dejando al sensor en su forma sensible al Tl^+ confinado en el citoplasma. Para activar a los canales de K^+ , las células fueron estimuladas con una mezcla de K^+ y Tl^+ (proporción de 15:1), siendo la concentración final de K^+ de 60 mM. El incremento de K^+ extracelular depolariza el potencial de membrana en reposo de las células, lo que produce la activación de canales iónicos dependiente de voltaje. El incremento de la fluorescencia en el ensayo representa una entrada

de TI^+ al interior celular, específicamente a través de canales Kv10.1 expresados en la membrana plasmática, lo que nos da una medida indirecta funcional de la actividad del canal. La intensidad de la fluorescencia es directamente proporcional al número de canales de K^+ abiertos. Con esta metodología se evaluó un kit de exploración para canales iónicos (Cat #: EK-103, Alomone labs), el cual contenía más de 20 compuestos y en el cual fue posible identificar 3 compuestos (Loperamida, Amlodipino y SR 33805 oxalato) con potente efecto inhibitorio sobre el Kv10.1 (Fig. 5). Estos compuestos fueron evaluados a una concentración de 50 μM . Debido a que los ensayos de fluorescencia son un método indirecto para cuantificar la actividad de un canal iónico, es necesario validar los resultados con experimentos electrofisiológicos, esto con el fin de descartar que los compuestos tengan otros efectos además de inhibir la actividad del Kv10.1.

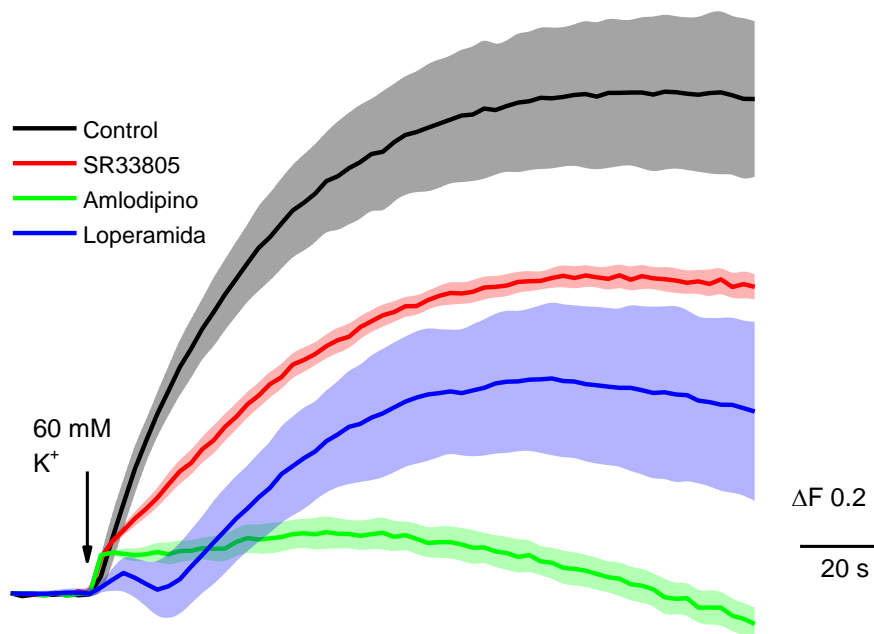


Figura 5. Intensidad de fluorescencia por influjo de Talio Tl^+ en la línea celular HEK-Kv10.1. La actividad del canal Kv10.1 fue evaluada usando el kit FLIPR® Potassium Assay. Las respuestas fueron inducidas con 60 mM de K^+ (flecha). Se encontró que los compuestos Loperamida (trazo azul), Amlodipino (trazo verde) y SR 33805 oxalato (trazo rojo) tenían un claro efecto inhibitorio, el cual se puede observar como una disminución de la amplitud de la respuesta con respecto a las respuestas control (trazo de color negro). Cada trazo representa el promedio (línea gruesa) y el error estándar (color desvanecido) de al menos 3 repeticiones. Los datos se encuentran normalizados con respecto a los trazos control.

2. Justificación

La investigación sobre el cáncer se ha centrado en la identificación de nuevos blancos farmacológicos para su tratamiento. Una idea generalizada es que la identificación de estos nuevos blancos promoverá el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra diversos tipos de tumores que hasta la fecha son intratables. Datos nuevos involucran a un nuevo paradigma en la progresión maligna del cáncer durante todas las etapas de su desarrollo; este nuevo paradigma se basa en la desregulación de canales iónicos de las células. Aunque el cáncer, debido a su complejidad multifactorial, aún no se concibe como una canalopatía, sin embargo, comienza a consolidarse el hecho de que la expresión anómala de canales iónicos se asocia positivamente a la progresión neoplásica y en la adquisición de un perfil molecular específico de célula tumoral.

El canal de K^+ Kv10.1 incrementa su expresión en alrededor del 70% de todos los tumores que se conocen, en contraste con una baja expresión en tejidos sanos. Varios estudios *in vitro* han demostrado una relación directa entre una alta expresión del canal Kv10.1 y una alta tasa de proliferación en diversas líneas celulares cancerosas, mientras que el bloqueo farmacológico o el silenciamiento genético disminuye dichas características. Lo anterior hace que este canal sea considerado como blanco molecular idóneo para la búsqueda de nuevos compuestos con potencial terapéutico para el tratamiento del cáncer.

3. Hipótesis

Los compuestos SR 33805 oxalato, Amlodipino y Loperamida (identificados en experimentos previos mediante influjo de talio (Tl^+)) tienen un efecto inhibitorio sobre la amplitud de las corrientes generadas por el canal Kv10.1.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Evaluar mediante ensayos electrofisiológicos el efecto los compuestos SR 33805 oxalato, Amlodipino y Loperamida sobre la amplitud de las corrientes iónicas generadas por el canal Kv10.1 expresado de forma estable en células HEK293.

4.2 Objetivos Particulares

- Evaluar mediante la técnica de *patch-clamp* en el modo de fijación de voltaje en la configuración de célula completa, el efecto de los fármacos SR 33805 oxalato, Amlodipino y Loperamida sobre las corrientes totales generadas en la línea celular HEK293 con expresión estable del canal Kv10.1.
- Obtener las curvas dosis-respuesta para los 3 compuestos antes descritos.
- Determinar si los efectos inhibitorios observados en los ensayos de fluorescencia muestran una correlación positiva con los resultados obtenidos mediante electrofisiología. Examinar la cinética del bloqueo para inferir el posible mecanismo de acción.

5. Metodología

5.1 Cultivos Celulares

Los experimentos se hicieron en las células *HEK293* (*Human Embryonic Kidney*, por sus siglas en inglés) que expresan de forma estable el canal de potasio Kv10.1 (HEK-Kv10.1) de humano (donadas gentilmente al LaNCa por el Dr. Walter Stühmer, del Instituto Max-Planck de Alemania) y células HEK293 silvestres (HEK-WT) que no expresan de forma nativa el canal Kv10.1; ambos tipos celulares se sembraron en placas de cultivo (Corning® Costar CL33524-100EA) de 24 pozos (3.8 cm²) a diferentes concentraciones (50000, 150,000 y 300,000 células/ml). Los cultivos celulares se mantuvieron en medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, 12320-032 Gibco), suplementado con 10% de suero bovino fetal, 1% de penicilina/estreptomicina y el antibiótico de selección zeocina (30 µg/ml; R25001 Invitrogen); las células se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂. Pasadas 18 a 24 horas después de sembradas, las células fueron tripsinizadas y depositadas en cristales circulares (12 mm de diámetro) durante 2 horas para su adhesión al cristal. Posteriormente los cristales con las células se colocaron en la cámara de registro para comenzar los registros electrofisiológicos.

5.2 Registro electrofisiológico

Las corrientes iónicas generadas por las células HEK-Kv10.1 fueron estudiadas mediante *patch-clamp* en el modo de fijación de voltaje en la configuración de célula completa.

Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (22 °C-25 °C) y las células fueron bañadas constantemente con solución extracelular estándar (ver tabla 1) mediante un sistema de perfusión por gravedad (2.4 ml/min). Para construir las gráficas de corriente contra voltaje (I-V), el potencial de membrana de las células se fijó a -70 mV, desde este voltaje las corrientes fueron activadas con pulsos de voltaje de -100 a +50 mV en pasos de 10 mV, los cuales tenían 250 ms de duración (Fig. 6a). Para obtener el curso temporal del efecto de los fármacos, así como el análisis estadístico se utilizó un pulso fijo a +50 mV con 250 ms de duración, aplicado cada 5 segundos.

Una característica biofísica de las corrientes generadas por el canal Kv10.1 es su nula inactivación dependiente del voltaje. Para estudiar el efecto de los fármacos sobre esta propiedad del canal se utilizó un protocolo de pulso doble: el voltaje de mantenimiento de las células se fijó a -70 mV, desde este voltaje las corrientes fueron activadas con prepulsos de voltaje (V_{pre}) de -110 a +50 mV, en pasos de 20 mV y una duración de 1.5 s; después de cada prepulso se dio un pulso de prueba a +30 mV con una duración de 500 ms. Las amplitudes de las corrientes se miden en el pulso de prueba y se normalizan (I/I_{max}). (Fig. 6b).

En estos experimentos se usaron pipetas con una resistencia de 3-5 M Ω fabricadas con capilares de vidrio de borosilicato (Kwik-Fil, WPI, USA). Cada pipeta se llenó con solución intracelular (ver tabla 1). Las corrientes se registraron con un amplificador Axopatch 200b (Molecular Devices), a una velocidad de muestreo de 10 kHz. Los datos se digitalizaron usando el conversor analógico-digital Axon Digidata 1550 (Molecular Devices). El control de los estímulos y la adquisición de los datos se realizó con el programa pClamp 10 (Molecular Devices).

Las gráficas dosis-efecto fueron ajustada con una ecuación de Hill usando el método de Levenberg–Marquardt incorporado en el software Origin 2016 (OriginLab Corporation):

$$Inhibición = Bmax \frac{c^n}{IC_{50}^n + c^n}$$

en donde, $Bmax$ es la inhibición máxima, IC_{50} la concentración a la cual se inhibe el 50% de la corriente, c es la concentración del compuesto y n es el coeficiente de Hill.

Todos los compuestos fueron almacenados a -20 °C en stocks disueltos en DMSO y a una concentración de 100 mM. Para los experimentos electrofisiológicos los compuestos se disolvieron a la concentración deseada en solución extracelular normal de registro. Los compuestos fueron aplicados directamente a la célula de interés mediante un sistema de inyección por presión Picospritzer™ II (General Valve), el cual mediante un sistema de inyección a presión baña la célula con cada

compuesto, este sistema permite la perfusión de compuestos en volúmenes de microlitros (μL).

5.3 Análisis estadístico

Todos los resultados fueron graficados y analizados usando los paquetes de software Origin 2016 (OriginLab) y GraphPad Prism 6. Para el análisis estadístico se usaron pruebas t-student para datos pareados.

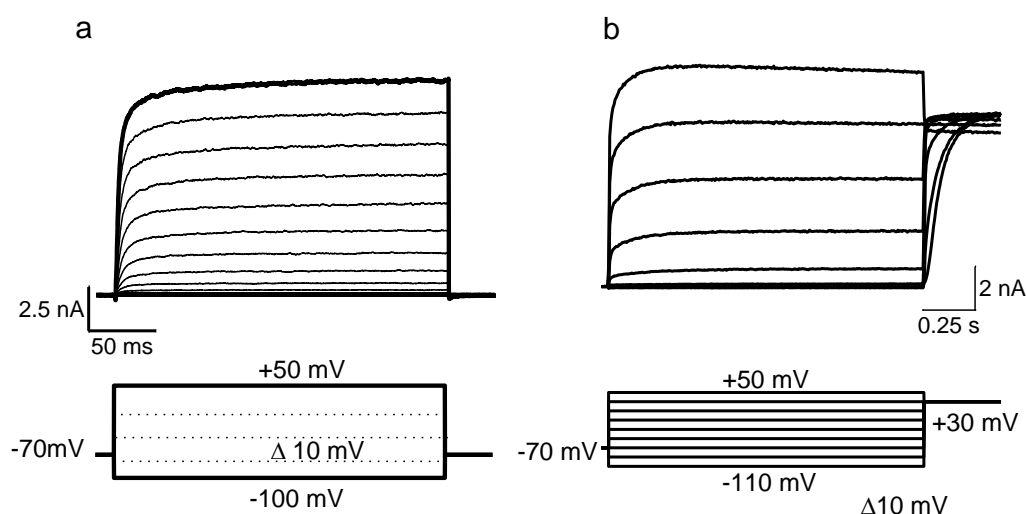


Figura 6. Protocolo para estudiar las corrientes mediadas por la activación del canal Kv10.1. (a) Se muestra el protocolo para la obtención de las gráficas corriente-voltaje, aplicando pulsos de -100 mV a +50 mV con un $\Delta 10$ mV, para su análisis se tomó el intervalo de 260 a 262 ms. (b) Protocolo para la obtención de las curvas de inactivación, consiste en un pulso doble de voltaje, el pulso de prueba va de -110 a +50 mV con un $\Delta 20$ mV (con una duración de 1.5 s) y el pulso de prueba a +30 mV (con 500 ms de duración).

Tabla 1. Componentes de las soluciones intracelular y extracelular (todas en mM), ambas soluciones tienen un pH 7.4 y 300 mOsm. SEC = solución extracelular y SIC = solución intracelular.

	HEK-Kv10.1		HEK-WT
	SEC	SIC	SEC
NaCl	137	-	137
KCl	5.4	140	5.4
MgCl ₂	1.2	1	1.2
CaCl ₂	2	-	2
Glucosa	10	-	10
EGTA	-	10	-
HEPES	10	10	10
TEA	2		-

6. Resultados

6.1 Las células HEK-WT no expresan corrientes de K⁺ endógenas

Lo primero que realicé fue determinar si las corrientes generadas por las células HEK-Kv10.1 eran mediadas por la expresión del canal Kv10.1 y no por otro canal de K⁺ que tuviera una expresión endógena. Para tal objetivo comparé las corrientes iónicas generadas por pulsos depolarizantes entre células HEK293 silvestres (HEK-WT) y las células HEK-Kv10.1. Dichos experimentos mostraron que las corrientes iónicas generadas por dichas líneas celulares eran diferentes (Fig. 7a-b). Las células HEK-WT no generaban corrientes dependientes de voltaje, y sus características sugieren que pertenecen a corrientes iónicas descritas como de fuga (*leak*). Por otra parte, las células HEK-Kv10.1 generaban corrientes que incrementaban su amplitud en función del voltaje; dichas corrientes fueron parecidas a las ya descritas en la literatura para los canales Kv10.1, es decir eran corrientes que incrementan su amplitud mientras más depolarizado era el potencial de membrana, estas corrientes se activaban lentamente y no se observó inactivación durante la duración del estímulo de voltaje. De dichos registros se cuantifico la densidad de corriente (medida a +50 mV) de la línea celular HEK-Kv10.1 fue de 0.43 ± 0.09 nA/pF ($n = 6$), en cambio las células HEK-WT se observó una densidad de corriente de 0.01 ± 0.00 nA/pF ($n = 6$). Dichos valores mostraron ser estadísticamente significativos ($p < 0.01$) (Fig. 7c). Además, con estos registros se obtuvieron las gráficas de relación corriente vs voltaje (I-V) y se pudo observar que las corrientes en las células HEK-WT tenían una relación lineal con el voltaje, mientras que en las HEK-Kv10.1 las corrientes tenían un comportamiento rectificante de salida, idéntico a lo descrito para los canales Kv10.1 (Fig. 8d). Estos resultados demuestran que las células HEK-Kv10.1 expresan de forma estable el canal de potasio Kv10.1.

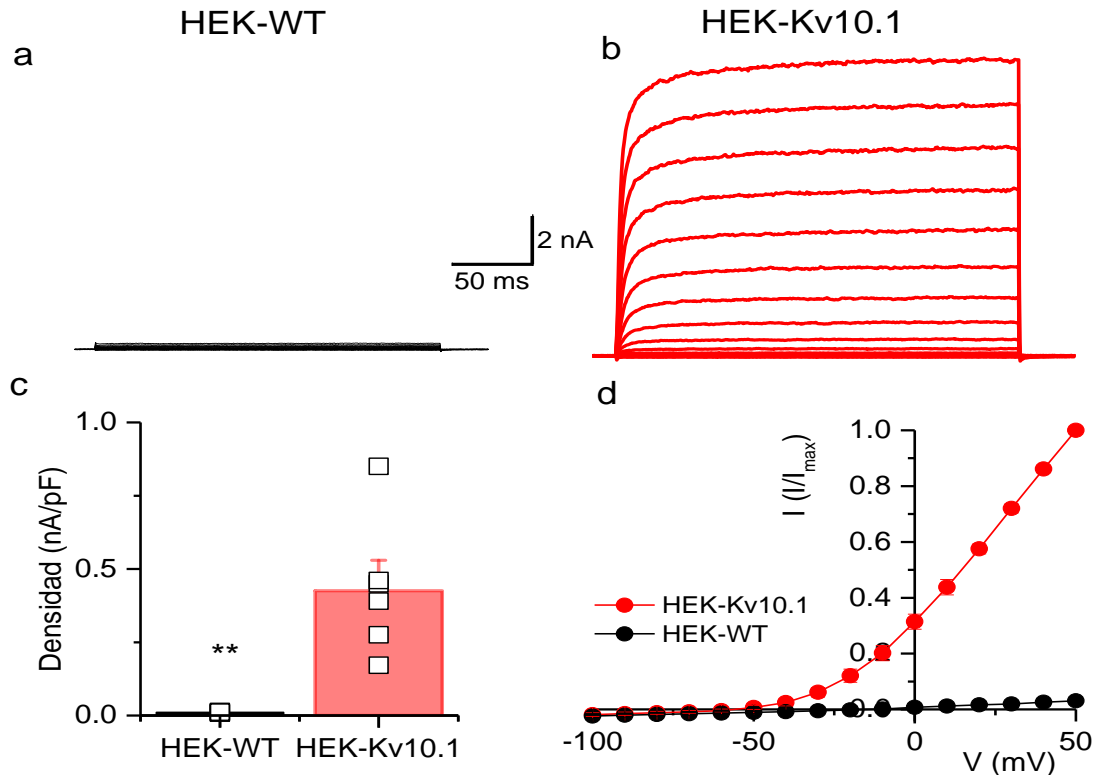


Figura 7. Comparación de las corrientes iónicas generadas en las células HEK-WT y HEK-Kv10.1. (a) Corrientes generadas por la línea celular HEK-WT ante pulsos de voltaje depolarizantes. (b) Corriente generadas por la línea celular HEK-Kv10.1 ante el mismo protocolo de estimulación. (c) Comparación de la densidad de corriente (nA/pF) en ambas líneas celulares. (d) Gráficas corriente-voltaje (I-V) de las líneas celulares HEK-WT (n = 6) y HEK-Kv10.1 (n = 6). Los datos son presentados como el promedio \pm el error estándar. ** = $p < 0.01$.

6.2 Efecto de Amlodipino, SR 33805 y Loperamida sobre la actividad de los canales Kv10.1

Con los resultados previos obtenidos mediante fluorescencia automatizada se observó que una serie de compuestos, provenientes de un kit de exploración para canales iónicos, disminuían la actividad del canal Kv10.1. A pesar de que los ensayos de fluorescencia (utilizados para evaluar la actividad de canales iónicos) son un excelente método para la obtención de resultados de forma muy eficiente, tienen la desventaja de que estos nos ofrecen una medida indirecta de la actividad de canales iónicos, debido a que la técnica que permite observar y evaluar la

funcionalidad de los canales iónicos es la electrofisiología, se procedió a validar el efecto de los compuestos que modularon la señal de fluorescencia del canal Kv10.1 mediante la técnica de *patch-clamp*. Los compuestos a ensayar fueron: Amlodipino, SR 33805 oxalato y Loperamida.

6.2.1 Efecto del Amlodipino sobre las corrientes Kv10.1

El Amlodipino es un compuesto perteneciente a la familia de las dihidropiridinas y descrito previamente como un inhibidor de canales de calcio tipo L y T, y con uso en la clínica para el tratamiento de la hipertensión arterial (Godfraind, 2017).

En células HEK-Kv10.1, se evaluó el efecto de Amlodipino sobre las corrientes iónicas generadas por el Kv10.1, los rangos de concentración evaluados fueron: 1, 3, 10 y 100 μM . Para la aplicación de los compuestos se utilizó el sistema de inyección por presión Picospritzer™ II. Únicamente observamos un efecto estadísticamente significativo a una concentración de 100 μM . A esta concentración se observó que el Amlodipino producía una reducción del 29.3% sobre la amplitud de las corrientes Kv10.1 medidas a +50 mV, con valores control de 4.3 ± 1.2 nA y en presencia del Amlodipino de 3.4 ± 0.7 nA ($n = 7$; $p < 0.05$) (Fig. 8 a-c). Aunque no se muestra en la figura, el efecto del Amlodipino fue reversible durante el lavado. El efecto inhibitorio del Amlodipino pareciera ser dependiente de la concentración, sin embargo, las concentraciones de 1 μM ($n = 4$), 3 μM ($n = 3$) y 10 μM ($n = 4$) no produjeron una disminución significativa sobre la amplitud de las corrientes ($p > 0.05$) (Fig.8c). No fue posible ensayar este compuesto a concentraciones más altas debido a un aparente efecto citotóxico, ya que la aplicación a 300 μM producía una pérdida inmediata del sello de registro. Con los porcentajes de inhibición se graficaron en función de la concentración para generar las curvas dosis-efecto. Los porcentajes de inhibición fueron ajustados con la ecuación de Hill y se obtuvo una IC_{50} de 508.8 ± 168.7 μM . Los efectos observados a altas concentraciones de Amlodipino (>100 μM) nos hacen suponer que el efecto inhibitorio observado en los ensayos de fluorescencia puede ser debido a un efecto citotóxico del compuesto sobre las células en lugar de un efecto directo sobre la actividad del canal.

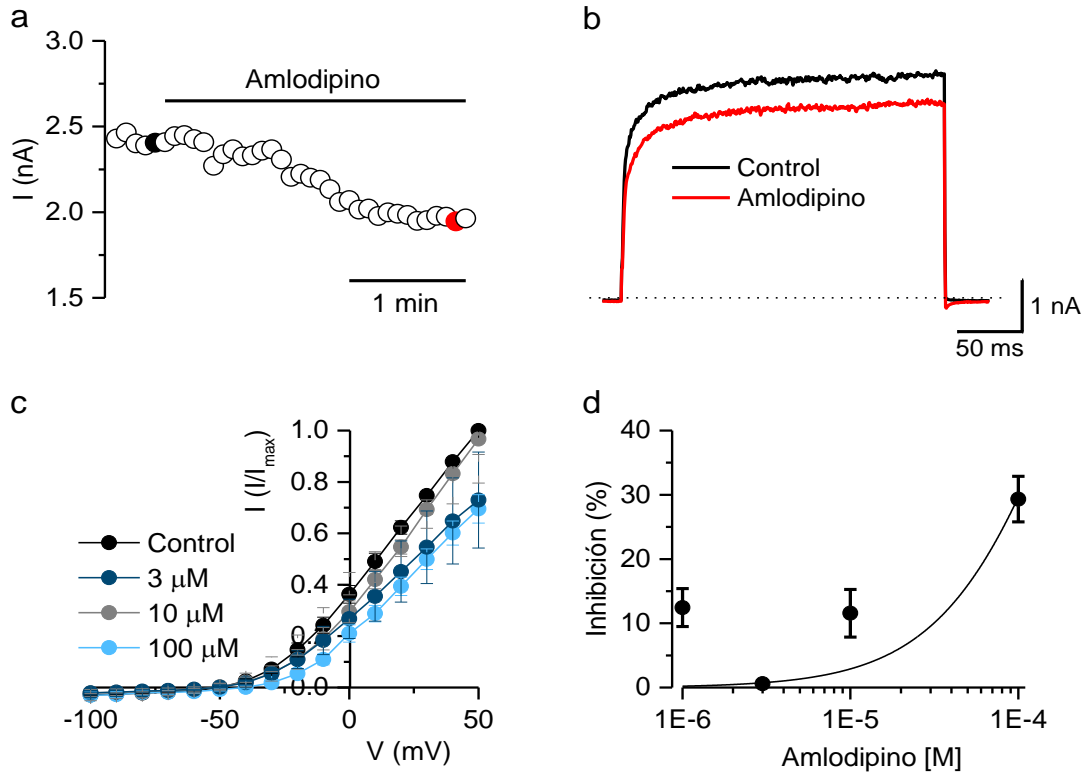


Figura 8. Efecto de Amlodipino sobre las corrientes iónicas generadas por el canal Kv10.1. (a) Curso temporal del efecto de Amlodipino (100 μ M) sobre las corrientes iónicas generadas por el Kv10.1 a un voltaje de +50 mV. (b) Registros de corrientes Kv10.1 producidas por un pulso de voltaje a +50 mV en control (negro) y con 100 μ M de Amlodipino (rojo). El color de los registros se corresponde con los puntos del mismo color de la figura en (a). Las líneas punteadas representan 0 nA de corriente. (c) Curvas corriente-voltaje bajo diferentes concentraciones de Amlodipino. (d). Gráfica dosis-respuesta de Amlodipino, la línea sólida representa el ajuste con la ecuación de Hill. Los datos representan el promedio \pm el error estándar.

6.2.2 Efecto de SR 33805 oxalato sobre las corrientes Kv10.1

El SR 33805 oxalato ([N - [dimetoxi-3,4-fenetil] - N -metil-amino-propoxil] -4-bencenosulfonil] -2-isopropil-3-metil-1-indol) oxalato (abreviado de ahora en adelante en el texto como SR) es un potente inhibidor de canales de Ca^{2+} . Este compuesto se une de forma alostérica a la subunidad $\alpha 1$ de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje del tipo L. En cardiomiocitos de ratón, este compuesto bloquea los canales de Ca^{2+} y por tanto el influjo de Ca^{2+} (Cazorla et al, 2003; Romey & Lazdunski 1994).

Al igual que en experimentos previos, el SR se evaluó sobre las corrientes iónicas mediadas por el Kv10.1. Las concentraciones usadas para este compuesto fueron: 1, 10, 100 y 300 μM (Fig. 9).

A la máxima concentración ensayada (300 μM) el SR produjo una disminución estadísticamente significativa del 45.4% sobre la amplitud de las corrientes Kv10.1 medidas a +50 mV, con valores en situación control de 8.1 ± 2.5 nA y en presencia de SR de 4.4 ± 1.4 nA (n=4; p<0.05) (Fig. 9a-c). A una concentración de 100 μM se observó que el SR produjo una disminución del 12.9% sobre las corrientes Kv10.1, de 10.0 ± 1.9 nA en situación control y 8.7 ± 1.6 nA en presencia del SR (n= 4; p<0.05). Los efectos del SR fueron reversibles durante el lavado. Con concentración menores a 100 μM SR no produjo efectos estadísticamente significativos sobre las corrientes Kv10.1, 10 μM (n= 4; p>0.05,) y 1 μM (n= 4; p>0.05). Al realizar las curvas dosis-efecto con los porcentajes de inhibición y al ajustar una ecuación de Hill se obtuvo una IC_{50} para SR 33805 de 597.3 ± 169.4 μM (Fig. 9d).

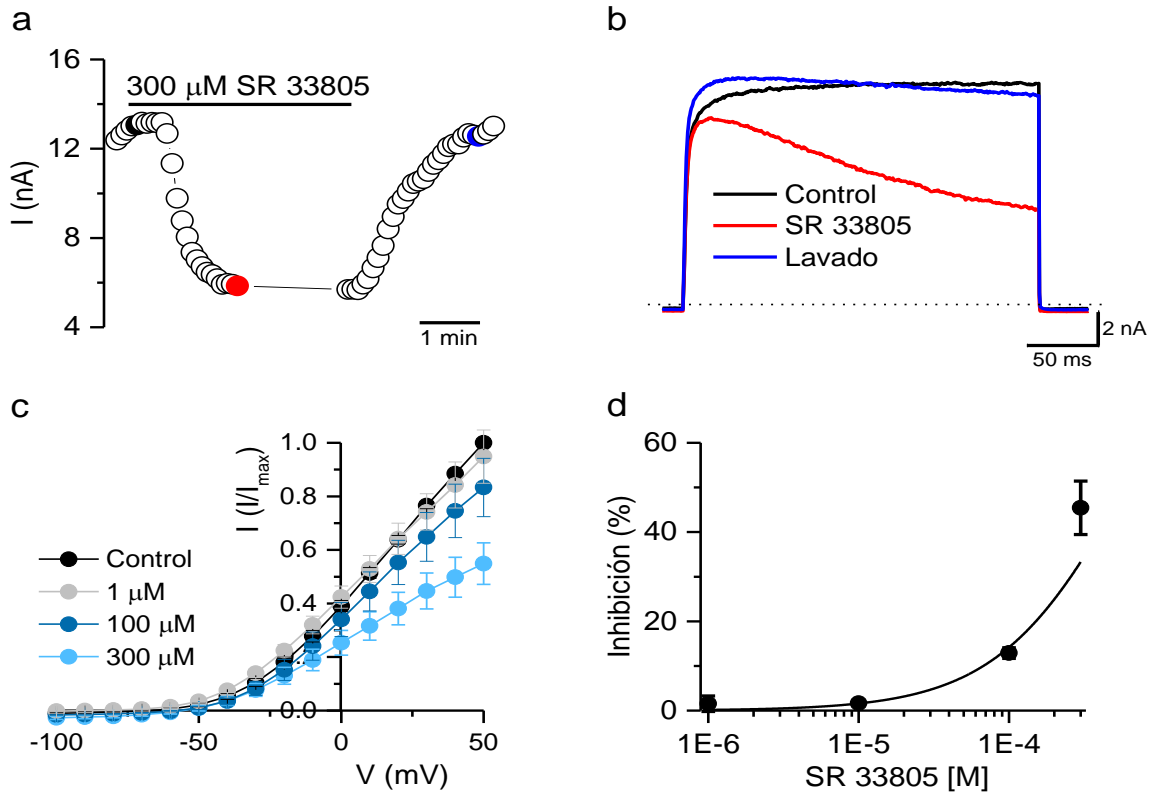


Figura 9. Efecto de SR 33805 oxalato sobre las corrientes iónicas generadas por el canal Kv10.1. (a) Curso temporal del efecto de SR (300 μM) sobre las corrientes iónicas generadas por el Kv10.1 a un voltaje de +50 mV. (b) Registros de corrientes Kv10.1 producidas por un pulso de voltaje a +50 mV en control (negro) y con 300 μM de SR (rojo) y durante el lavado (azul). El color de los registros se corresponde con los puntos del mismo color de la figura en (a). La línea punteada representa 0 nA de corriente (c) Curvas corriente-voltaje bajo diferentes concentraciones de SR. (d). Gráfica dosis-respuesta de SR, la línea sólida representa el ajuste con la ecuación de Hill. Los datos representan el promedio \pm el error estándar.

6.2.3 Efecto de la Loperamida sobre las corrientes Kv10.1

La Loperamida es un agonista que actúa sobre el receptor opioide Mu (μ). Este fármaco es un derivado sintético de la fenilpiperidina y es usado mundialmente como medicamento para tratar varios síndromes diarreicos. Además de agonista del receptor opioide Mu, la Loperamida se ha descrito como un inhibidor de canales NMDA, HCN, de canales de calcio dependientes de voltaje y del canal

hERG. La Loperamida tiene la característica de no cruzar barrera hematoencefálica (Wu et al, 2017).

Con los protocolos utilizados anteriormente, se evaluó el efecto de la Loperamida a las siguientes concentraciones: 0.1, 1, 10, 100 y 300 μM sobre la actividad del canal Kv10.1. A una concentración de 300 μM , la Loperamida producía una inhibición de las corrientes Kv10.1 del 89.4%, con valores de 7.6 ± 1.0 nA en situación control y del 0.8 ± 0.2 nA en presencia de la Loperamida ($n = 4$; $p < 0.001$) (Fig. 10a-c). El porcentaje de inhibición disminuyó conforme a la concentración del compuesto. A una concentración de 100 μM el porcentaje de inhibición fue del 82.1% ($n = 9$; $p < 0.001$) con valores control de 7.8 ± 1.0 nA y 1.2 ± 0.3 nA en presencia de Loperamida (Fig. 10c). El porcentaje de inhibición de la Loperamida a las diferentes concentraciones ensayadas fue ajustado con la ecuación de Hill, arrojando un valor de $\text{IC}_{50} = 32.5 \pm 3.4$ μM (Fig. 10d).

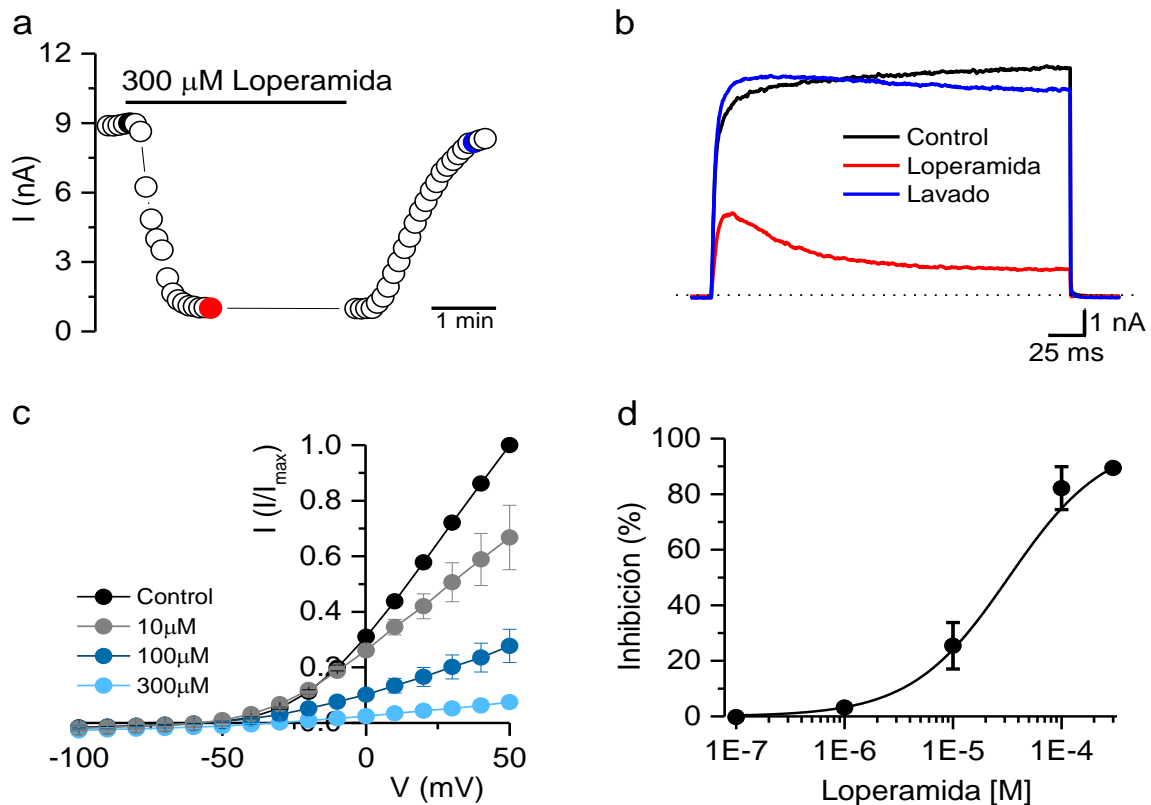


Figura 10. Efecto de la Loperamida sobre las corrientes iónicas generadas por el canal Kv10.1. (a) Curso temporal del efecto de la Loperamida (300 μ M) sobre las corrientes iónicas generadas por el Kv10.1 a un voltaje de +50 mV. (b) Registros de corrientes Kv10.1 producidas por un pulso de voltaje a +50 mV en control (negro) y con 300 μ M de Loperamida (rojo) y lavado (azul). El color de los registros se corresponde con los puntos del mismo color de la figura en (a). Las líneas punteadas representan 0 nA de corriente (c) Curvas corriente-voltaje bajo diferentes concentraciones de Loperamida. (d) Gráfica dosis-respuesta de Loperamida, la línea sólida representa el ajuste con la ecuación de Hill. Los datos representan el promedio \pm el error estándar.

Para facilitar la visualización del efecto de los compuestos ensayados, se graficó su porcentaje de efecto inhibitorio sobre la corriente generada por el Kv10.1 a una concentración de 100 μ M. Como se puede observar en la figura 11, la Loperamida es la que tiene el efecto inhibitorio más potente sobre las corrientes Kv10.1.

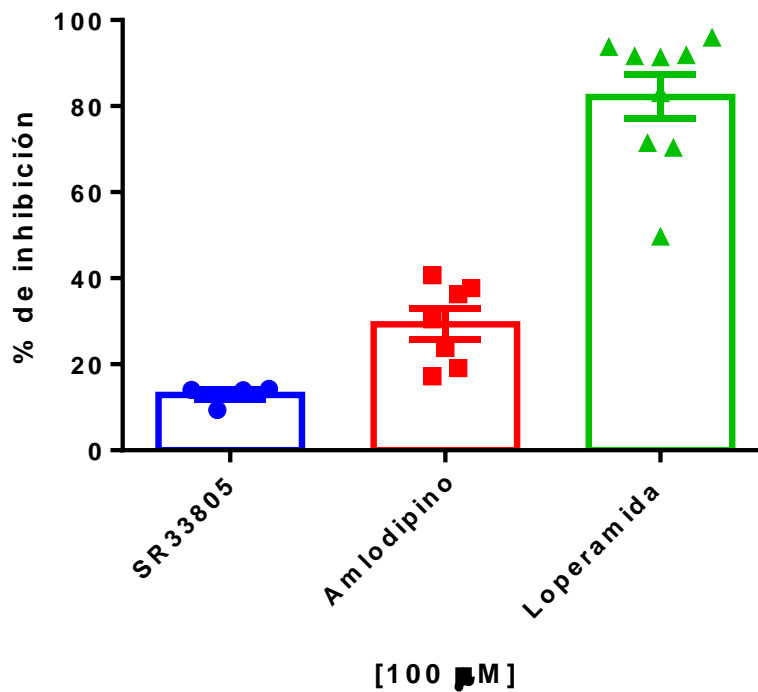


Figura 11. Gráfico que representa el porcentaje de bloqueo que presentan SR 33805, Amlodipino y Loperamida a una concentración de 100 μ M.

6.3 Efecto del SR y la Loperamida sobre la inactivación dependiente de voltaje del canal Kv10.1

Como se describió en un inicio, las corrientes generadas por Kv10.1 muestran muy poca inactivación dependiente de voltaje, sin embargo, se han descrito algunos compuestos como el Mibefradil y Astemizole que aceleran dicha característica. En los experimentos previos usando el SR y la Loperamida se observa que estos compuestos parecían modificar la inactivación dependiente de voltaje del Kv10.1. Para caracterizar este fenómeno se aplicó un protocolo de doble pulso de voltaje, el cual consistió en aplicar un primer pulso (prepulso) de voltaje desde -110 hasta +50 mV con Δ 20 mV (este pulso duró 1,5 s). Después de cada prepulso de voltaje, se aplicó un pulso de prueba a +30 mV para estudiar la disponibilidad de los canales para abrirse. Para las gráficas de inactivación las corrientes se normalizan de la forma I_2/I_{2max} , en donde I_2 representa la corriente Kv10.1 medida durante el pulso de prueba (+30 mV), I_{2max} es la corriente

máxima obtenida durante el pulso de prueba. En condiciones control, la corriente Kv10.1 medida en el pulso de prueba (+30 mV) no disminuyó en función del prepulso de prueba (Fig. 12a y c; Fig. 13a y c). En contraste, la aplicación de SR (300 μ M) disminuyó la magnitud de las corrientes medidas durante el pulso de prueba a + 30 mV por lo tanto produjo inactivación dependiente de voltaje del Kv10.1, la cual no se observa en los trazos control (Fig. 12b y c); la inactivación dependiente de voltaje en presencia de SR fue estadísticamente significativa a partir de un voltaje de prepulso de -10 mV ($p < 0.05$, $n = 3$). Concentraciones menores de 300 μ M de SR no modificaron la inactivación dependiente de voltaje del Kv10.1 (Fig. 12c).

En el caso de la Loperamida está parecía ejercer un efecto significativo sobre la inactivación dependiente de voltaje del Kv10.1. En situación control, la inactivación dependiente de voltaje de las corrientes Kv10.1 no se modificó y fue muy similar a la obtenida en la serie experimental con SR (Fig. 13a y c). Sin embargo, en presencia de Loperamida, presentó inactivación dependiente de voltaje desde concentraciones bajas (10 μ M). Con 100 y 300 μ M de Loperamida, la inactivación fue estadísticamente diferente a partir de -70 mV ($p < 0.05$, $n = 5$) con 300 μ M y a partir de -50 mV con 100 μ M de Loperamida ($p < 0.05$, $n = 4$) (Fig. 13b y c).

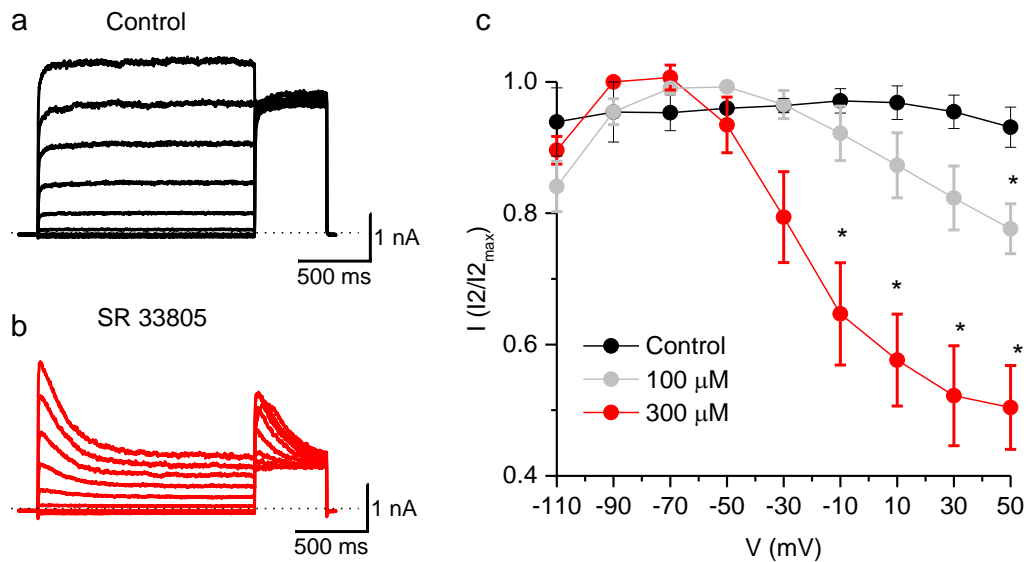


Figura 12. Efecto de la SR 33805 sobre la inactivación dependiente de voltaje del Kv10.1. (a) Corrientes Kv10.1 en situación control generadas con un protocolo de doble pulso de voltaje (ver metodología) para estudiar la inactivación dependiente de voltaje del canal Kv10.1 (b) Corrientes Kv10.1 en presencia de SR 33805 (300 μ M) generadas por un protocolo de doble pulso de voltaje. En a y b las líneas punteadas representan 0 nA de corriente. (c) Gráfica de inactivación dependiente de voltaje del Kv10.1 en control (negro, $n = 4$) y con 100 ($n = 4$) y 300 μ M ($n = 3$) de SR 33805 (gris y rojo, respectivamente). Los registros se normalizaron de la forma (I_2/I_{2max}) y se graficaron en función del prepulso de voltaje (I_2 representa la corriente medida durante el pulso de prueba a +30 mV).

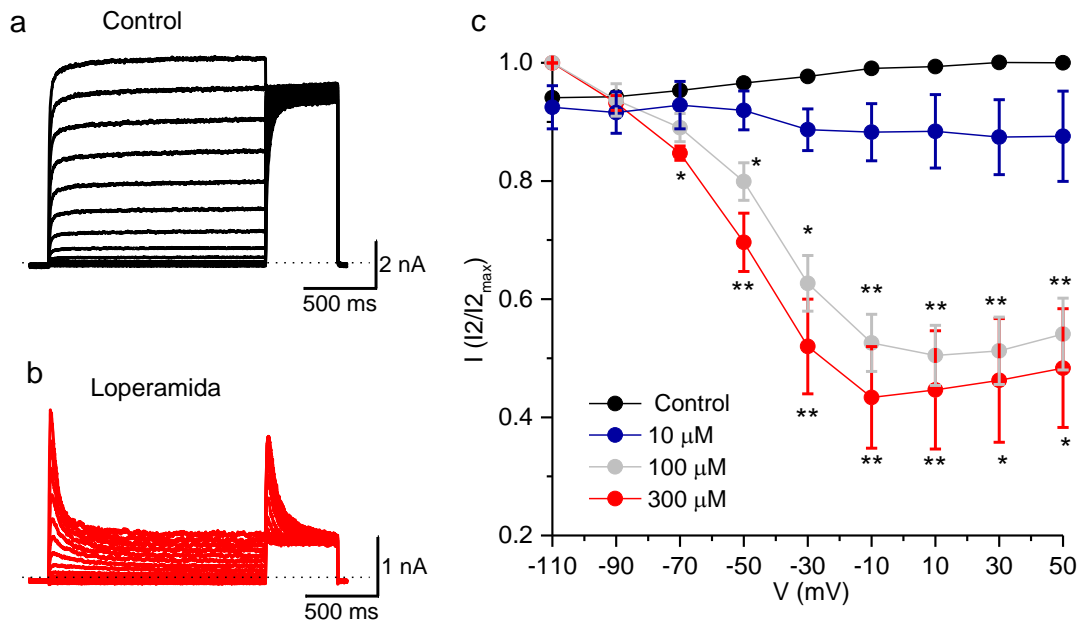


Figura 13. Efecto de la Loperamida sobre la inactivación dependiente de voltaje del Kv10.1. (a) Corrientes Kv10.1 en situación control generadas con un protocolo de doble pulso (ver métodos) para estudiar la inactivación dependiente de voltaje del canal Kv10.1 (b) Corrientes Kv10.1 en presencia de Loperamida (300 μ M) generadas por un protocolo de doble pulso de voltaje. En a y b las líneas punteadas representan 0 nA de corriente. (c) Gráfica de inactivación dependiente de voltaje del Kv10.1 en control (negro, $n = 4$) y con 3 concentraciones de Loperamida: 10 ($n = 4$), 100 ($n = 4$) y 300 μ M ($n = 5$) (azul, gris y rojo, respectivamente). Los registros se normalizaron de la forma (I_2/I_{2max}) y se graficaron en función del voltaje del prepulso (I_2 representa la corriente medida durante el pulso de prueba a +30 mV).

7. Discusión

En esta tesis se muestra por primera vez que el Amlodipino, el SR 33805 oxalato y la Loperamida tienen un efecto modulador sobre la actividad del canal de K^+ de Kv10.1. Los resultados previos en el LaNCa empleando ensayos de fluorescencia sugerían que dichos compuestos disminuyen la actividad de los canales Kv10.1. Dichos resultados fueron corroborados en esta tesis mediante experimentos electrofisiológicos. Sin embargo, a través de los experimentos electrofisiológicos se pudo comprobar que, a diferencia de los ensayos de fluorescencia, la Loperamida (100 μ M) tuvo un efecto inhibitorio 2.8 veces mayor que el Amlodipino (100 μ M), 82.1% contra un 29.3% de inhibición, respectivamente. En los experimentos de fluorescencia, el Amlodipino tuvo un efecto inhibitorio más potente, sin embargo en los experimentos electrofisiológicos se pudo observar que altas concentraciones de Amlodipino tenían efectos citotóxicos sobre las células; dichas observaciones nos hacen suponer que el efecto observado en fluorescencia con Amlodipino puede ser un falso positivo, y que la disminución en la fluorescencia se debe principalmente al daño que este compuesto produce sobre las células más que un efecto inhibitorio sobre el canal Kv10.1. Cabe mencionar que en los ensayos de fluorescencia los compuestos fueron pre-aplicados durante 5 minutos antes de comenzar el experimento, tiempo suficiente para ejercer un efecto sobre las células. En el caso del Amlodipino, este es un inhibidor de los canales de calcio dependientes de voltaje Cav2.1. En los canales Cav2.1 se ha reportado una IC_{50} para Amlodipino de aproximadamente 10 μ M, es decir una potencia alrededor de 20 veces mayor que lo que nosotros demostramos sobre el canal Kv10.1 (Godfraind, 2017).

El efecto inhibitorio más potente sobre la activación de la corriente fue ejercido por el compuesto antidiarreico Loperamida (comercialmente conocido como Imodium). La Loperamida fue descrita inicialmente como un agonista de los receptores opioides Mu (μ), aunque también muestra cierta afinidad por los receptores opioides delta (δ) y kappa (κ), con efectos en el rango nanomolar (nM). Por el contrario, algunos efectos antagonistas de la Loperamida han sido reportados

sobre canales de calcio dependientes de voltaje activados a altos umbrales (HVA, por sus siglas in inglés), canales activados por nucleótidos cíclicos (HCN) y sobre canales activados por glutamato del tipo NMDA (Church et al, 1994). Cabe destacar, que los rangos de efecto, así como las IC_{50} , sobre esos canales son muy cercanos a los empleados en esta tesis. Estudios más recientes han mostrado que la Loperamida también ejerce efectos analgésicos a través de la inhibición de canales de Na^+ dependientes de voltaje, teniendo un efecto preferente sobre los canales Nav1.8 (Wu et al, 2017). En este trabajo se describe que el efecto inhibitorio sobre los canales de Nav es mediado parcialmente por la activación de receptores opioides. En nuestro caso, el efecto inhibitorio observado fue estrictamente sobre las corrientes Kv10.1, debido a que los receptores a opioides no se expresan en células HEK (Gharagozlou et al, 2002).

El hecho que la Loperamida tenga la capacidad de inhibir diferentes tipos de canales iónicos dependientes de voltaje, sugiere que este compuesto podría unirse a una región estructuralmente conservada de ellos. Para lo cual se necesitan realizar más experimentos para determinar con certeza el mecanismo de inhibición de la Loperamida sobre las corrientes mediadas por el canal Kv10.1.

Por otra parte, el SR 33805 es un compuesto descrito como inhibidor de canales de calcio de tipo L (Cazorla et al, 2003), aunque también presentó afinidad por el canal Kv10.1. Al igual que en los ensayos de fluorescencia, este compuesto fue el que menor efecto inhibitorio presentó durante los experimentos electrofisiológicos con una IC_{50} cercana a los 600 μM en comparación con la IC_{50} reportada por Cazorla et al, 2003 de 2.4 nM en los canales de calcio de tipo L.

Una observación del efecto inhibitorio de los compuestos SR 33805 y la Loperamida su aplicación produjo inactivación dependiente de voltaje del canal Kv10.1. La inactivación dependiente de voltaje está presente en el canal Kv10.1 de *Drosophila* (Brüggemann et al, 1993), sin embargo, esta inactivación no está reportada en el canal Kv10.1 de rata, ratón y humano. No obstante, la inactivación dependiente de voltaje puede inducirse farmacológicamente, ejemplos de este efecto han sido reportados con el Astemizole (García-Ferreiro et al, 2004),

Mibefradil (Gómez-Lagunas, Carrillo, Pardo, & Stühmer, 2017) y el ICA105574 (Garg et al, 2012).

El efecto sobre la inactivación dependiente de voltaje del Kv10.1 ha sido descrito a través de dos mecanismos: 1) la unión del compuesto en la cavidad central del poro (bloqueador de poro) y 2) un efecto indirecto que afecte el desplazamiento del sensor de voltaje. Un ejemplo de bloqueador del poro es el Astemizole, mientras que un ejemplo del segundo tipo de mecanismo es el del compuesto ICA105574. Se ha reportado que la unión de Mibefradil al Kv10.1 se realiza en el lado extracelular del canal, impidiendo la disponibilidad de que los canales puedan activarse al cambiar el voltaje del canal. Con los resultados aquí presentados no podemos concluir cual es el mecanismo responsable de acelerar la inactivación dependiente de voltaje en presencia del SR 33805 y la Loperamida. Una característica que presentan los canales Kv es que se modulan de manera alostérica por el dominio sensor de voltaje (Catterall, 2011), esto podría sugerir que el efecto de inactivación previamente visto es debido a la unión de los compuestos al segmento S4 de los Kv10.1 que sienten el voltaje de membrana.

Dado que los compuestos ensayados en esta tesis muestran poca selectividad al canal Kv10.1, y tienden a inhibir más de un canal iónico, eso disminuye su potencial a ser utilizados como herramientas terapéuticas; no obstante, el mecanismo de acción a través de cual ejercen sus efectos parecen ser muy diferentes, lo que sugiere que podrían estar actuando en diversos sitios de modulación del canal. Conocer los sitios específicos en lo que estos compuestos se unen en el canal, puede ayudar al desarrollo de nuevos compuestos con mayor selectividad o potencia, con miras en el desarrollo de nuevas terapias para tratar diversos tipos de cáncer a los cuales se encuentra asociado el Kv10.1.

Finalmente, en esta tesis evaluamos mediante experimentos electrofisiológicos los compuestos que mostraron disminución de la actividad de los canales Kv10.1 evaluados por técnicas de fluorescencia. Esto permite tener la certeza de que los ensayos de fluorescencia a través del influjo de talio pueden facilitar la búsqueda de nuevos compuestos con efecto modulador no sólo sobre los canales Kv10.1,

sino también sobre otros canales de potasio que se encuentren asociados a diversas patologías humanas.

8. Conclusiones

1. Con base a los resultados obtenidos mediante electrofisiología, podemos decir que los ensayos de fluorescencia a través de influjo de talio representan un método efectivo para la búsqueda de compuestos con actividad sobre canales Kv10.1, así como otros tipos de canales de K⁺.
2. Los compuestos Loperamida, SR 33805 y Amlodipino inhiben las corrientes generada por los canales de Kv10.1 de una forma dependiente de concentración. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales los fármacos ejercen sus acciones se desconocen.
3. El fármaco Loperamida mostró un potencial inhibitorio mayor con una IC₅₀ menor a SR 33805 y Amlodipino. Se mostró que el compuesto Amlodipino tenía un efecto menor sobre la actividad del Kv10.1 además de mostrar una toxicidad a concentraciones altas, afectando la turgencia de las células.
4. La Loperamida y el SR 33805 aceleran la inactivación dependiente de voltaje, sin embargo, se requieren realizar más experimentos para determinar si esto sucede a través de un bloqueo del poro o a través del sensor de voltaje.
5. Los compuestos que pueden inhibir de manera específica la actividad de los canales Kv10.1 son muy escasos. Por lo tanto, la estrategia de búsqueda de medicamentos disponibles en el mercado con acción sobre este canal puede ser una forma de disponer de fármacos con posible efecto terapéutico contra algunos tipos de cáncer.

9. Bibliografía

- Ackerman, M., Claphan, D. (1997). Ion channels- Basic science and clinical disease. *The new England Journal of Medicine*, 336(22): 1575-1585.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell*. Fifth Edition. USA. Garland Science.
- Bear, M., Connors, B., Paradiso, M. (2016). *Neurociencia. La exploración del cerebro*. (4° edición). México: Wolters Kluwer.
- Bauer, C. K., & Schwarz, J. R. (2001). Physiology of EAG K⁺ Channels. *The Journal of Membrane Biology*, 182(1), 1–15. <http://doi.org/10.1007/s00232-001-0031-3>.
- Bezaniilla, F. (2008). How membrane proteins sense voltage. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(4), 323-332. doi:10.1038/nrm2376.
- Brelidze, T. I., A. E. Carlson, B. Sankaran and W. N. Zagotta (2012). Structure of the carboxy-terminal region of a KCNH channel. *Nature* 481(7382): 530-533.
- Brüggemann, A., Pardo, L. A., Stühmer, W., & Pongs, O. (1993). Ether-à-go-go encodes a voltage-gated channel permeable to K⁺ and Ca²⁺ and modulated by cAMP. *Nature*, 365, 445. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/365445a0>.
- Catterall, W. A. (2011). Ion Channel Voltaje Sensors: Structure, function, and Pathophysiology. *Pathophysiology*, 67(6), 915–928. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.021>.
- Catterall, W.A., Chandy K.G., & Gutman G.A, eds. (2002) *The IUPHAR Compendium of Voltage-gated Ion Channels*. IUPHAR Media, Leeds, UK.
- Cazorla, O., Lacampagne, A., Fauconnier, J., & Vassort, G. (2003). SR 33805, a Ca²⁺ antagonist with length-dependent Ca²⁺-sensitizing properties in cardiac myocytes. *British Journal of Pharmacology*, 139(1), 99–108. <http://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705221>.

- Church, J., Fletcher, E. J., Abdel-Hamid, K., & MacDonald, J. F. (1994). Loperamide blocks high-voltage-activated calcium channels and N-methyl-D-aspartate-evoked responses in rat and mouse cultured hippocampal pyramidal neurons. *Molecular Pharmacology*, 45(4), 747 LP-757.
- Ferreiro, R., Kerschensteiner, D., Major, F., Monje, F., Stühmer, W., Pardo, L. (2004). Mechanism of Block of hEag1 K⁺ Channels by Imipramine and Astemizole. *Journal of General Physiology*. 124(4): 301–317.
- García-Ferreiro RE, Kerschensteiner D, Major F, Monje F, Stühmer W & Pardo LA (2004) Mechanism of Block of hEag1 K⁺ Channels by Imipramine and Astemizole. *J. Gen. Physiol.* 124: 301–317 Available at: <http://www.jgp.org/lookup/doi/10.1085/jgp.200409041>.
- Garg, V., Sachse, F. B., & Sanguinetti, M. C. (2012). Tuning of EAG K⁺ channel inactivation: Molecular determinants of amplification by mutations and a small molecule. *The Journal of General Physiology*, 140(3), 307–324. <http://doi.org/10.1085/jgp.201210826>.
- Gharagozlou, P., Demirci, H., Clark, J. D., & Lameh, J. (2002). Activation profiles of opioid ligands in HEK cells expressing δ opioid receptors. *BMC Neuroscience*, 3, 1–8. <http://doi.org/10.1186/1471-2202-3-19>.
- Godfraind, T. (2017). Discovery and development of calcium channel blockers. *Frontiers in Pharmacology*, 8(MAY), 1–25. <http://doi.org/10.3389/fphar.2017.00286>.
- Gómez-Lagunas, F., Carrillo, E., Pardo, L. A., & Stühmer, W. (2017). Gating Modulation of the Tumor-Related Kv10.1 Channel by Mibefradil. *Journal of Cellular Physiology*, 232(8), 2019–2032. <http://doi.org/10.1002/jcp.25448>.
- Han, B., Tokay, T., Zhang, G., Sun, P., & Hou, S. (2017). Eag1 K⁺ Channel: Endogenous Regulation and Functions in Nervous System. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. <http://doi.org/10.1155/2017/7371010>.

Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., & MacKinnon, R. (1994). Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophysical Journal*, 66(4), 1061–1067. [http://doi.org/10.1016/S0006-3495\(94\)80887-2](http://doi.org/10.1016/S0006-3495(94)80887-2).

Hemmerlein, B., Weseloh, R. M., de Queiroz, F. M., Knötgen, H., Sánchez, A., Rubio, M. E., Pardo, L. A. (2006). Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours. *Molecular Cancer*, 5, 1–13. <http://doi.org/10.1186/1476-4598-5-41>.

Hille, B. (2011). *Ion Channels of excitable membranes*. USA: Sinauer Associates Inc.

Jenke, M., Sánchez, A., Monje, F., Stühmer, W., Weseloh, R. M., & Pardo, L. A. (2003). C-terminal domains implicated in the functional surface expression of potassium channels. *The EMBO Journal*, 22(3), 395–403. <http://doi.org/10.1093/emboj/cdg035>.

Kaplan, W.D. and Trout, W.E. 3rd. (1969) The behavior of four neurological mutants of *Drosophila*. *Genetics*, 61, 399–409.

Karp, G. (2016). *Biología celular y Molecular. Conceptos y Experimentos* (5^o edición). México: McGraw Hill Latinoamérica.

Kew, J., Davies, C. (2010). *Ionic channels: From structure to function* (2th edition). Oxford Press. New York, USA.

Kim, J.-B. (2014). Channelopathies. *Korean Journal of Pediatrics*, 57(1), 1. <http://doi.org/10.3345/kjp.2014.57.1.1>.

Klein, M. G., Haigney, M. C. P., Mehler, P. S., Fatima, N., Flagg, T. P., & Krantz, M. J. (2016). Potent Inhibition of hERG Channels by the Over-the-Counter Antidiarrheal Agent Loperamide. *JACC: Clinical Electrophysiology*, 2(7), 784–789. <http://doi.org/10.1016/j.jacep.2016.07.008>.

Kuang, Q., Purhonen, P., & Hebert, H. (2015). Structure of potassium channels. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(19), 3677–3693. <http://doi.org/10.1007/s00018-015-1948-5>.

Martin, S., Lino de Oliveira, C., Mello de Queiroz, F., Stühmer, W., Del Bel, E. (2008). Eag1 potassium channel immunohistochemistry in the CNS of adult rat and selected regions of human brain. *Neuroscience*, 26;155(3):833-44.

McIntosh, B. E., J. B. Hogenesch & C. A. Bradfield (2010). Mammalian PerArntSim proteins in environmental adaptation. *Annu Rev Physiol* 72: 625-645.

Mortensen, L. S., H. Schmidt, Z. Farsi, A. Barrantes-Freer, M. E. Rubio, R. Ufartes, J. Eilers, T. Sakaba, W. Stühmer, and L. a. Pardo: 2014, KV10.1 opposes activity dependent increase in Ca²⁺ influx into the presynaptic terminal of the parallel fibre - Purkinje cell synapse. *The Journal of physiology* 1, 181–196. (page 6).

Moss, A. J., & Kass, R. S. (2005). Long QT syndrome: from channels to cardiac arrhythmias. *The Journal of clinical investigation*, 115(8), 2018-24.

Occhiodoro, T., Bernheim, L., Liu, J. H., Bijlenga, P., Sinnreich, M., Bader, C. R., & Fischer-Lougheed, J. (1998). Cloning of a human ether-a-go-go potassium channel expressed in myoblasts at the onset of fusion. *FEBS Letters*, 434(1–2), 177–182. [http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00973-9](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00973-9)

Ouadid-Ahidouch, H., Ahidouch, A., & Pardo, L. A. (2016). Kv10.1 K⁺ channel: from physiology to cancer. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 468(5), 751–762. <http://doi.org/10.1007/s00424-015-1784-3>.

Pardo LA. (1999). Oncogenic potential of EAG K⁺ channels. *EMBO J.* 18: 5540–5547 Available at: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1093/emboj/18.20.5540>.

Pardo, L. A., & Stühmer, W. (2014). The roles of K⁺ channels in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 14(1), 39–48. <http://doi.org/10.1038/nrc3635>.

Peruzzo R, Biasutto L, Szabò, Leanza L. (2016). Impact of intracellular ion channels on cancer development and progression. *European Biophysics Journal*, 45 (7), 685-707.

Potter, N. T., Tapper, A. R., & George, A. L. (2003). Heterologous Expression of Ion Channels. *Neurogenetics*, 217, 285–294. <http://doi.org/10.1385/1-59259-330-5:285>.

Purves, D; Augustine, G; Fitzpatrick, D; Hall, W; LaMantia, A; White, L. (2015). Neurociencia. Editorial Médica Panamericana.

Rodríguez-Rasgado, J. A., Acuña-Macías, I., & Camacho, J. (2012). Eag1 channels as potential cancer biomarkers. *Sensors (Switzerland)*, 12(5), 5986–5995. <http://doi.org/10.3390/s120505986>.

Romey, G., & Lazdunski, M. (1994). Effects of a new class of calcium antagonists, SR33557 (fantofarone) and SR33805, on neuronal voltage-activated Ca⁺⁺ channels. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 271(3), 1348 LP-1352.

Schönherr, R., Löber, K., Heinemann, S.H. (2000). Inhibition of human ether a´ go-go potassium channels by Ca²⁺/calmodulin. *EMBO J.* 19:3263–3271.

Swartz, K. J. (2004). Towards a structural view of gating in potassium channels. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(12), 905–916. <http://doi.org/10.1038/nrn1559>.

Urrego-Blanco, D. E. (2014). Dynamics of Kv10. 1 Expression Through the Cell Cycle of Cancer and Non-cancer Cells (Doctoral dissertation, Niedersächsische Staats-und Universitätsbibliothek Göttingen).

Wang, X., Chen, Y., Zhang, Y., Guo, S., Mo, L., An, H., & Zhan, Y. (2017). Eag1 Voltage-Dependent Potassium Channels: Structure, Electrophysiological Characteristics, and Function in Cancer. *Journal of Membrane Biology*, 250(2), 123–132. <http://doi.org/10.1007/s00232-016-9944-8>.

Whicher, J. R., & Mackinnon, R. (2016). Alternative Voltage Sensing Mechanism, 353(6300), 664–669. <http://doi.org/10.1126/science.aaf8070>.Structure.

Wu, Y., Zou, B., Liang, L., Li, M., Tao, Y. X., Yu, H., ... Li, M. (2017). Loperamide inhibits sodium channels to alleviate inflammatory hyperalgesia. *Neuropharmacology*, 117, 282–291. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.02.010>.

Wulff, H., Castle, N. A., & Pardo, L. A. (2009). Voltage-gated Potassium Channels as Therapeutic Drug Targets. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 8(12), 982–1001. <http://doi.org/10.1038/nrd2983>.