



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Búsqueda de agentes que interfieran con la función del canal $K_v10.1$ implicado en la biología de distintos tipos de cáncer

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Erika Monserrat Torres Morales

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Arturo Hernández Cruz
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Juan Carlos Gómora Martínez
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

Dr. Froylán Gómez Lagunas
[Facultad de Medicina, UNAM](#)

Ciudad de México, abril, 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 en el Instituto de Fisiología Celular-UNAM en la Ciudad de México, México.



Agradecimiento

Este trabajo fue financiado por el Laboratorio Nacional de Canalopatías Consolidación II, con el apoyo del Dr. William Lee de la Coordinación de la Investigación Científica, también agradezco el apoyo de la UNAM (PAPIIT-IG200119)

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (**PAEP**) por el apoyo otorgado para asistir al LXI Congreso Nacional de la Sociedad de Ciencias Fisiológicas del 12 al 16 de agosto de 2018 que se llevó a cabo en la Universidad de Colima.

Beca **CONACYT** con el número de Registro Becario: **621289** y el número de apoyo: **465688**

Agradecimientos técnicos

Parte de este trabajo se realizó con el apoyo técnico del **Biol. Héctor Miguel Cardoso Torres**, quien preparo la biblioteca de 900 fracciones polipeptídicas pertenecientes a venenos de diferentes animales ponzoñosos, dichas fracciones fueron aisladas mediante Cromatografía Líquida de Alta Presión en Fase Reversa (RP-HPLC) como parte del Laboratorio Nacional de Canalopatías. De dicha biblioteca se seleccionaron las fracciones polipeptídicas del alacrán *Centruroides noxius*.

Parte de este trabajo se realizó con el apoyo técnico del **T.L Fredy Ingerborg Coronas Valderrama**, quien aisló por Cromatografía Líquida de Alta Presión en Fase Reversa (RP-HPLC) las fracciones polipeptídicas pertenecientes al veneno del alacrán *Centruroides noxius* evaluadas en el presente trabajo.

Parte de este trabajo se realizó con el apoyo técnico de la **Dra. Georgina Gurrola Briones**, quien llevo a cabo la síntesis de péptido CnF7.1C con el que se elaboraron la mayoría de los experimentos aquí mostrados.

Parte de este trabajo se realizó con el apoyo técnico de la **Dra. Arlet del Carmen Loza Huerta**, quien estandarizo el ensayo para la evaluación de la acción de fracciones polipeptídicas usando el kit de potasio FLIPR a partir del cual obtuvo los resultados del tamizaje primario en el Laboratorio Nacional de Canalopatías.

Al **Fis. Cesar Oliver Lara Figueroa**, por el apoyo técnico del presente trabajo en el Laboratorio Nacional de Canalopatías.

Contenido

Lista de figuras	7
Lista de abreviaturas.....	8
Introducción.....	9
Canales de potasio activados por voltaje.....	10
Familia de canales Ether-a-go-go	11
Los canales iónicos y el cáncer.....	11
Estructura de Kv10.1	12
Expresión de Kv10.1.....	14
Kv10.1 y cáncer	14
Toxinas como moduladores de canales iónicos	16
Avances recientes sobre la inhibición de Kv10.1	18
Justificación	20
Objetivos.....	21
Objetivos particulares.....	21
Hipótesis.....	21
Material y Método	22
Cultivo celular	22
Tamizaje primario de la actividad de diferentes fracciones sobre el canal Kv10.1 por fluorescencia	22
Registros electrofisiológicos con la técnica de Patch-clamp.....	23
Resultados	24
Tamizaje (<i>screening</i>) primario	24
Electrofisiología.....	28
Discusión.....	32
Conclusiones.....	35
Anexo.....	36
Referencias	37

Lista de figuras

Figura 1. Modelo de rEag1 Δ unido a calmodulina (CaM).....	13
Figura 2. Resumen de la participación de Kv10.1 en la carcinogénesis y los mecanismos que son responsables de su expresión aberrante en células tumorales.....	16
Figura 3. Ilustración de un canal de potasio típico activado por voltaje.....	17
Figura 4. Mecanismos por los cuales las toxinas interfieren con la función de los canales activados por voltaje.....	17
Figura 5. Efecto de las fracciones polipeptídicas aisladas del veneno del alacrán <i>Centruroides noxius</i>	25
Figura 6. Efecto de 12 fracciones polipeptídicas aisladas del veneno del alacrán <i>Centruroides noxius</i>	26
Figura 7. Efecto de las fracciones polipeptídicas aisladas del veneno del alacrán <i>Centruroides noxius</i>	27
Figura 8. Efecto de la SEC sobre la corriente generada por Kv10.1	28
Figura 9. Efecto de la fracción CnF10 sobre la corriente generada por Kv10.1	29
Figura 10. Efecto de la fracción CnF7 sobre la corriente generada por Kv10.1	30
Figura 11. Efecto de diferentes fracciones polipeptídicas sobre la corriente generada por el canal Kv10.1	31
Anexo 1. Corrección de la intensidad máxima	36

Lista de abreviaturas

aa	Aminoácidos
DP	Dominio del poro
DSV	Dominio sensible a voltaje
Eag1	Canal de potasio Ether-a-go-go 1
ER α	Receptor de estrógeno α
HEK	Human embryonic kidney
HIF	factor inducible por hipoxia
IV	Corriente-voltaje
SFB	Suero fetal bovino
SEC	Solución extracelular
TEA	Tetraetilamonio
VPH E7	virus del papiloma humano temprano 7
VEGF	factor de crecimiento endotelial vascular

Introducción

Los canales iónicos son proteínas transmembranales que permiten el flujo de iones a ambos lados de la membrana. Estas proteínas participan en procesos fisiológicos tales como la excitabilidad, contracción muscular, ritmo cardíaco, secreción de insulina, reacción inmune, y proliferación celular. En particular los canales de potasio activados por voltaje son esenciales en los tejidos excitables, debido a que su actividad está regulada por cambios en el voltaje de membrana, de manera que regulan la excitabilidad celular y la liberación del neurotransmisor. Los canales de potasio también participan en la señalización de muchos otros procesos celulares, incluyendo la regulación del volumen celular, proliferación, o muerte celular programada, y su desregulación está asociada con varias enfermedades, incluyendo el cáncer.

En condiciones normales, en humanos, el canal de potasio dependiente de voltaje Ether-a-go-go-1 (también llamado Eag1, $K_v10.1$, KCNH1) se expresa en principalmente en el sistema nervioso central y durante las primeras etapas de diferenciación de los mioblastos. El canal $K_v10.1$, es el primer canal con probado potencial oncogénico ya que se encuentra en el 70% de células tumorales de origen diverso, y está involucrado en proliferación, angiogénesis, migración, sobrevivencia e invasión. Este canal representa un atractivo blanco terapéutico, dada su localización en la superficie celular y sus bien conocidas propiedades farmacológicas; aunado a que las células neuronales que expresan normalmente el canal $K_v10.1$ están protegidas por la barrera hematoencefálica o representan el estado terminal de la diferenciación normal, las terapias dirigidas a este canal resultarían sólo con efectos secundarios menores.

Puesto que los moduladores de canales iónicos han sido utilizados durante mucho tiempo para el desarrollo de fármacos dirigidos para el tratamiento de diversas enfermedades, por ejemplo, la diabetes, la hipertensión, o el dolor; no resulta descabellado pensar que la búsqueda de moduladores del canal $K_v10.1$ pudieran funcionar como un posible tratamiento contra el cáncer. Un tratamiento

dirigido a los canales iónicos resulta muy atractivo por la razón de su alta especificidad, ya que un modulador de canal puede llegar a ser muy selectivo debido a que la interacción física entre el modulador y el canal no se da propiamente en la vía de permeación o poro, sino que ocurre en el vestíbulo extracelular en donde la secuencia es muy variable y específica en cada canal.

Canales de potasio activados por voltaje

Los canales de potasio activados por voltaje (K_v) responden a cambios en el voltaje transmembranal permitiendo el flujo de potasio a favor de su gradiente electroquímico y de este modo, tienden a hacer que el voltaje de membrana sea o se acerque al predicho por la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz. Los canales K_v son tetrámeros y cada subunidad comprende seis segmentos transmembranales (S1-S6). Los segmentos S1-S4 forman el dominio sensor de voltaje (DSV), que contiene varios residuos cargados positivamente, los cuales se mueven en respuesta a cambios del voltaje de membrana. El movimiento del DSV se acopla al dominio del poro (DP) formado por S5-S6 mediante un enlace entre S4 y S5 (Long S. B, Campbell, & Mackinnon, 2005a). En las estructuras conocidas de los canales K_v (Long, Tao, Campbell, & MacKinnon, 2007), así como de canales de sodio (Payandeh, Scheuer, Zheng, & Catterall, 2011) y calcio (Wu et al., 2015) activados por voltaje, el enlace S4-S5 es una hélice de 15 residuos de aminoácidos paralela a la membrana celular, situada por encima de S6. Se propone que en esta posición, el enlace S4-S5 actúa como una palanca que realiza trabajo mecánico en S6 para abrir y cerrar el poro del canal cuando la hélice cargada S4 es impulsada por el campo eléctrico transmembranal (Long S. B., Campbell, & Mackinnon, 2005b).

Los canales K_v se pueden dividir en 12 subfamilias (K_{vs} 1-12). La familia Ether-a-go-go (EAG), incluye a los canales K_v 10-12, y muestran homología de secuencia con los canales K_v 1-9 (González et al., 2012).

Familia de canales Ether-a-go-go

El descubrimiento de mutaciones que provocan que las moscas *Drosophila melanogaster* se agiten o dancen fue un importante descubrimiento en neurociencias, debido a que condujo a la identificación de genes que codifican para una serie de canales iónicos que son selectivamente permeables a potasio. El gen mutado recibió el nombre de "Ether-a-go-go" (EAG) porque las moscas se mueven como bailarinas a-go-go en respuesta a la exposición a vapores de éter (Warmke, Drysdale, & Ganetzky, 1991) y codifica para los miembros de la familia KCNH, que son canales de potasio activados por voltaje (K_v), y participan en procesos críticos de la regulación de la excitabilidad celular, latido cardíaco irregular (síndrome de QT largo cardíaco), epilepsia y cáncer (Morais-Cabral & Robertson, 2015).

Los canales de potasio pertenecientes a la familia Ether-a-go-go son modulados durante el ciclo celular, muestran una rectificación inducida por la activación del factor promotor de la mitosis (Brüggemann, Stühmer, & Pardo, 1997a) y sus propiedades conductoras cambian a lo largo del ciclo celular (Pardo, Brüggemann, Camacho, & Stühmer, 1998), además otros miembros de la familia se expresan diferencialmente durante el ciclo celular (Crociani et al., 2003).

Los canales iónicos y el cáncer.

A lo largo de la historia los canales iónicos han estado bien establecidos como objetivos terapéuticos en células excitables, sin embargo, su vinculación con estados de enfermedad en células no excitables es relativamente reciente. En particular, en la carcinogénesis, se han identificado un número significativo de canales iónicos directamente relacionados con el cáncer, incluyendo canales de sodio, cloruro, calcio y potasio (Pardo & Stühmer, 2008a).

En particular dos canales de potasio de la familia Ether-a-go-go han sido ampliamente estudiados en su relación con el cáncer, el canal hERG (KCNH2, $K_v11.1$) y el $K_v10.1$. Debido a sus propiedades oncogénicas, su distribución

restringida en el tejido normal y su expresión ubicua en células tumorales, el canal $K_v10.1$ ha ganado interés como herramienta de detección y terapia contra el cáncer, además se sugiere que también puede ser usado como marcador y signo temprano del desarrollo tumoral, o bien como herramienta para el diagnóstico de otros trastornos relacionados con la proliferación celular (Farias et al., 2004).

Estructura de $K_v10.1$

$K_v10.1$ es miembro de la familia EAG que produce corriente selectiva a potasio, y que presenta poca o ninguna inactivación ante un estímulo sostenido (Ludwig et al., 1994) y comparte una estructura muy similar a la de otros canales de potasio regulados por voltaje. $K_v10.1$ es un tetrámero con cuatro subunidades idénticas, cada una contiene seis segmentos transmembranales (S1-S6). La región del poro la forman los segmentos S5 y S6 y es altamente selectiva al potasio, y el dominio S4 actúa como un sensor de voltaje (Whicher & MacKinnon, 2016). Además tiene tres dominios intracelulares, un dominio N-terminal Per-ARNT-Sim (PAS) que se ha asociado con la detección de oxígeno y la activación del factor inducible por hipoxia (HIF) (Morais Cabral et al., 1998; Semenza, 1998), un dominio C-terminal que actúa como un dominio C-enlazador, y un dominio C-terminal homólogo de unión a nucleótidos cíclicos (CNBHD) (**Figura 1**) (Whicher & MacKinnon, 2016). El dominio C-enlazador y CNBHD son homólogos a los dominios intracelulares de los canales activados por hiperpolarización (HCN) y los activados por nucleótidos cíclicos (CNG), en los que la unión de nucleótidos cíclicos a su dominio de CNBD se acopla al poro mediante el dominio C-enlazador (Zagotta et al., 2003). En la familia EAG, una parte de la secuencia CNBHD ocupa el sitio putativo de unión a nucleótidos cíclicos, que impide su unión y los convierte en canales insensibles a los nucleótidos cíclicos (Haitin, Carlson, & Zagotta, 2013).

Además, la estructura de $K_v10.1$ presenta una “torreta extracelular” que no se ha observado en otros canales K_v y cuyo análisis de secuencia sugiere que, de los canales K_v , la familia Eag es la única que tiene esta torreta extracelular. Parte

de la torreta forma una hélice, que se posiciona paralela a la membrana e interactúa con S6. Ahí se encuentran dos sitios de glicosilación en la torreta. En esta posición, la cadena de azúcares rodea la abertura extracelular del poro formando un impedimento que debería prevenir la unión de toxinas inhibitoras, y que explicaría por qué hasta el momento no se había identificado ninguna toxina para $K_v10.1$ (Whicher & MacKinnon, 2016).

Los canales de potasio activados por voltaje se abren por el movimiento del sensor de voltaje transmembranal, el cual está acoplado al poro del canal a través del “enlace” S4-S5. Sin embargo, a diferencia de otros canales, el enlace S4-S5 de $K_v10.1$ consiste en un bucle de apenas cinco residuos de aminoácidos, como resultado, los segmentos transmembranales del canal $K_v10.1$ no se intercambian de dominio, lo que sugiere un mecanismo alternativo de activación dependiente del voltaje (Whicher & MacKinnon, 2016).

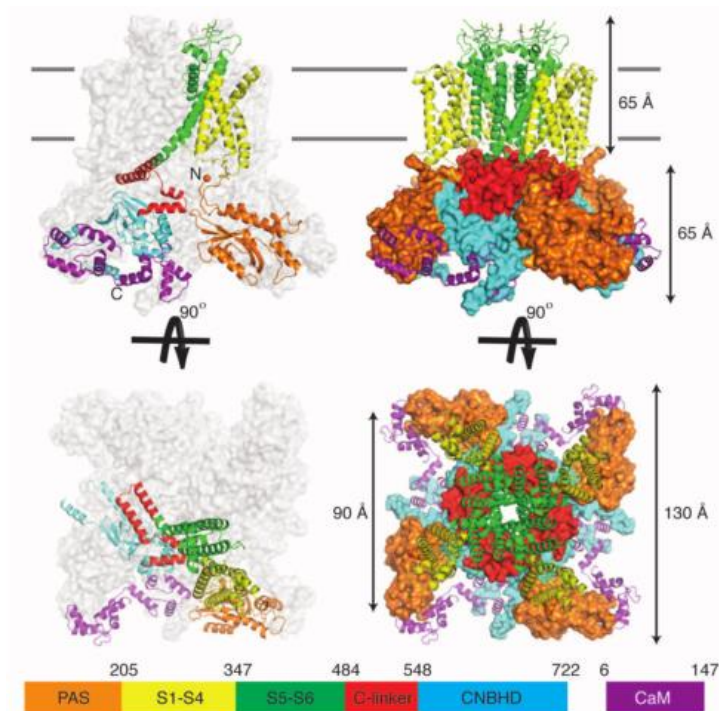


Figura 1. Modelo de rEag1Δ unido a calmodulina (CaM). Cada dominio se muestra en diferente color como se indica en la parte inferior de la figura y la membrana celular se muestra como líneas grises. (Izquierda) Vista frontal (arriba) y superior (abajo) de una subunidad coloreada, y las subunidades restantes se muestran en gris claro. (Derecha)

Vista frontal y superior de todos los dominios organizados en tetrámero. Se indica la longitud y el ancho de los dominios transmembranales e intracelulares. Los sitios de glicosilación observados en la torreta se muestran con palitos de color verde con rojo (Whicher & MacKinnon, 2016).

Expresión de Kv10.1

En condiciones normales, Kv10.1 se encuentra principalmente en el sistema nervioso central, donde se localiza en las terminales presinápticas y regula la liberación del neurotransmisor (Ludwig et al., 1994), principalmente en bulbo olfatorio, corteza, hipocampo y cerebelo (Ludwig et al., 2000). Además, Kv10.1 se expresa transitoriamente en el músculo esquelético, donde participa durante las primeras etapas de diferenciación de los mioblastos (Bijlenga et al., 1998), también se expresa ligeramente en la placenta (Crociani et al., 2003), donde participa en la regulación de la progresión del ciclo celular (Pardo et al., 1998).

Por otro lado, y de ahí su relevancia clínica, se ha observado que Kv10.1 se expresa de manera ectópica en el 70% de las células cancerígenas de origen diverso (de Queiroz, Suarez-Kurtz, Stühmer, & Pardo, 2006) incluyendo sarcomas (de Queiroz, Suarez-Kurtz, Stühmer, & Pardo, 2006) cáncer de mama (Farias et al., 2004), ovario (Asher et al., 2010), colon (Ousingsawat et al., 2007), leucemia mieloide aguda (Agarwal, Griesinger, Stühmer, & Pardo, 2010), entre otros.

Kv10.1 y cáncer

Las primeras indicaciones de que los canales de la familia EAG podrían tener un papel en el ciclo celular provinieron de observaciones en ovocitos de *Xenopus*, que demostraron que las propiedades electrofisiológicas de esta familia de canales cambian conforme avanza el ciclo celular. En dicho modelo experimental de expresión heteróloga, la amplitud de la corriente generada se redujo cuando se indujo la maduración del ovocito con progesterona o por el factor promotor de la mitosis (MPF) (Brüggemann, Stühmer, & Pardo, 1997b). Después, se sugirió que la

regulación del canal $K_v10.1$ durante la fase M podría estar asociada con re-arreglos del citoesqueleto (Camacho, Sánchez, Stühmer, & Pardo, 2000). El potencial oncogénico de $K_v10.1$ se descubrió cuando se transfectó el DNA que codifica para $K_v10.1$ en células de ovario de hámster chino (CHO) que normalmente no expresan el canal y se indujo una transformación. Las células CHO transfectadas con $K_v10.1$ fueron capaces de crecer en agregados y en presencia de bajas concentraciones de suero. Además, perdieron la inhibición por contacto celular y produjeron tumores cuando se inyectaron a ratones inmunosuprimidos (Pardo et al., 1999).

Se ha demostrado que $K_v10.1$ participa en la respuesta a hipoxia e induce angiogénesis en los tumores aumentando los niveles de HIF-1 α y la secreción del factor de crecimiento endotelial vascular VEGF (Downie et al., 2008). $K_v10.1$ influye en la progresión de la fase G1 del ciclo celular, aumentando la proliferación de células tumorales (Pardo & Stühmer, 2008b). Además, se sugiere que la sobreexpresión de $K_v10.1$ resulta en un potencial de membrana más negativo y por lo tanto en un aumento de la fuerza electromotriz en el flujo de Ca^{2+} , (Spitzner et al., 2007) durante una ruta de entrada de Ca^{2+} en la membrana plasmática denominada “entrada de Ca^{2+} operada por el almacén” (SOCE), es decir, durante la entrada capacitiva de Ca^{2+} (Golovina et al., 2001) y de ésta manera participaría indirectamente en promover la señalización de proliferación. Finalmente se propone que $K_v10.1$ podría participar en la invasión y metástasis por medio de su interacción con proteínas cruciales de la adhesión celular, tales como la cinasa de adhesión focal (FAK) y contractina (CTTN) (**Figura 2**) (Pardo & Stühmer, 2013).

Es importante destacar que el canal $K_v10.1$ podría regular algunas de las vías de señalización intracelulares por mecanismos independientes a su función como canal (Kaczmarek, 2006), sin embargo, su función como canal parece ser importante en algunas otras, como su participación indirecta de la señalización de calcio, pues su inhibición resultó en una disminución de la proliferación (Spitzner et al., 2007)

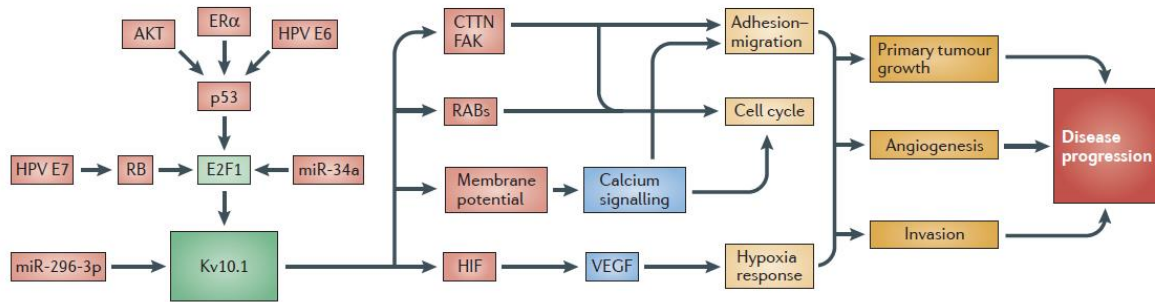


Figura 2. Resumen de la participación de Kv10.1 en la carcinogénesis y los mecanismos que son responsables de su expresión aberrante en células tumorales. El supresor de tumores p53 y el factor de transcripción E2F1, entre sus muchas otras funciones, activan la expresión de Kv10.1. La sobreexpresión de Kv10.1 afecta la migración y la proliferación de células tumorales a través de interacciones funcionales con las proteínas RAB (RAB5 y RAB11), cortactina (CTTN) y la cinasa de adhesión focal (FAK), así como a través de señalización del calcio y mediante su participación en la respuesta a hipoxia (Pardo & Stühmer, 2013).

Toxinas como moduladores de canales iónicos

Históricamente, se han utilizado toxinas de escorpión, araña, anémona de mar, caracol del género *Conus*, serpiente, rana, pez globo y veneno de insectos para obtener valiosa información sobre la función, estructura y sensibilidades farmacológicas de varios miembros de la familia de canales iónicos activados por voltaje, incluyendo los canales de potasio (K_v), sodio (Na_v) y calcio (Ca_v) (Kalia et al., 2016).

En general, las toxinas que interfieren con la función de los canales iónicos activados por voltaje lo hacen a través de dos mecanismos: 1) bloqueando el poro: interactúan con la región del poro y 2) modificando la activación del canal: interactuando con el dominio sensible al voltaje (**Figura 3**) (Kalia et al., 2016, Swartz, 2007).

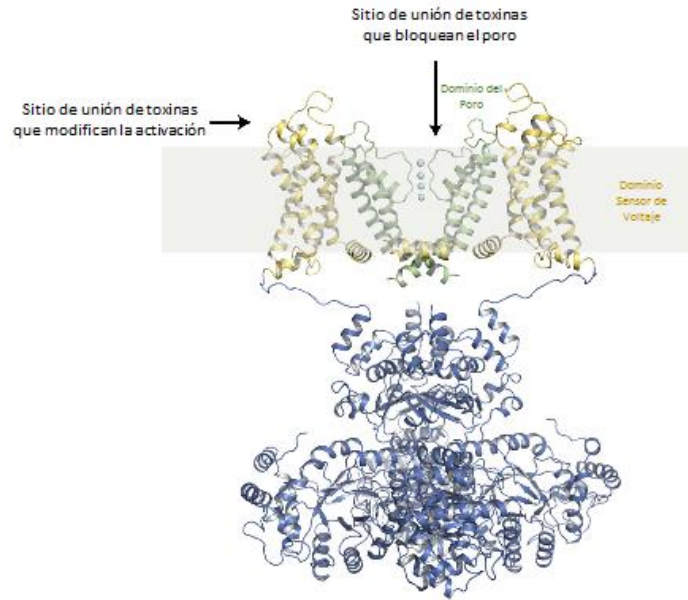


Figura 3. Ilustración de un canal de potasio típico activado por voltaje en donde se indican los sitios en que se puede unir una toxina para interferir con su función. Modificada de (Banerjee, Lee, Campbell, & Mackinnon, 2013).

Las toxinas que bloquean el poro del canal se unen a los sitios de unión para los iones de potasio, los cuales son responsables de la selectividad del canal (**Figura 4a**). Esta observación confirmó una hipótesis postulada anteriormente de cómo los iones de potasio intracelulares pueden permear a lo largo del poro e influir en la disociación de la toxina unida al extremo externo del poro (Mackinnon & Miller, 1988).

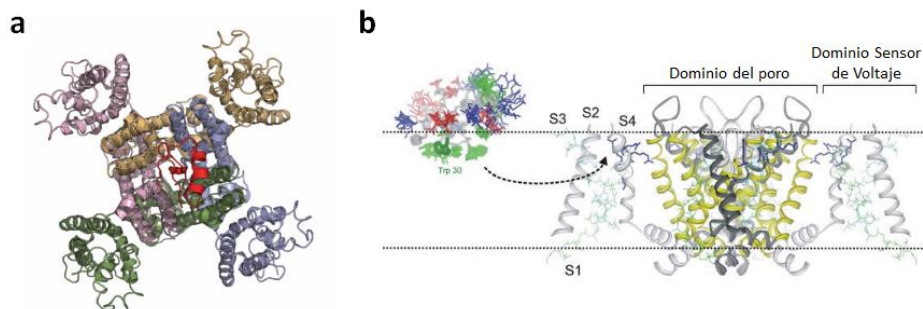


Figura 4. Mecanismos por los cuales las toxinas interfieren con la función de los canales activados por voltaje. a) Estructura cristalizada de Kv1.2 con Caribdotoxina (CTX)

unida, se puede observar cada subunidad del tetrámero en diferente color (rosa, naranja, verde y gris) y en rojo la CTX. b) Ilustración de hanatoxina insertada en la membrana antes de unirse al dominio sensor de voltaje. Modificada de (Banerjee et al., 2013; Swartz, 2007)

A diferencia de los bloqueadores del poro, las toxinas que modifican la activación del canal interactúan con el dominio sensible a voltaje para influir en su apertura (**Figura 4b**). Un aspecto intrigante de las toxinas que modifican la activación es su capacidad de interactuar con el motivo de paleta dentro del sensor de voltaje (hélice-giro-hélice S3b-S4) que se mueve en la interfaz lípido-proteína en la conformación de reposo, en cuyo caso el sensor de voltaje está enterrado dentro de la membrana lipídica (**Figura 4b**). Sin embargo, el carácter anfipático observado en la estructura de muchas toxinas de este tipo es coherente con la noción de que su partición dentro de la membrana puede ser necesaria para que la toxina alcance el canal (Milescu et al., 2009).

Una característica interesante de las toxinas dirigidas a sensores de voltaje es que pueden interactuar con diferentes familias de canales iónicos activados por voltaje. Tal comportamiento promiscuo ha sido observado en toxinas como la hanatoxina y la gramotoxina (Li-Smerin & Swartz, 1998). La focalización generalizada de motivos de paleta por toxinas animales resalta la importancia farmacológica de esta parte del sensor de voltaje.

Avances recientes sobre la inhibición de K_v10.1

Se han descrito varios compuestos capaces de inhibir al canal K_v10.1, sin embargo, ninguno ha resultado ser específico. Fármacos tales como el astemizol (García-Quiroz et al., 2014), imipramina (Gavrilova-Ruch et al., 2002), mibefradil (Gómez-Lagunas, Carrillo, Pardo, & Stühmer, 2017) amioradona (Barriga-Montoya et al., 2018) y la unión de la proteína calmodulina (Ludwig et al., 1994) han conducido a la inhibición de la corriente generada por Eag1.

Fue hasta el año 2007 cuando se diseñó un anticuerpo (mAb56) específico dirigido a K_v10.1 (Gómez-Varela et al., 2007) que reduce eficientemente el flujo de

iones a través del canal, además no se une a EAG2 (KCNH5, Kv10.2), ni interfiere en las propiedades fisiológicas relevantes de HERG. El mapeo de los epítomos reveló que la secuencia reconocida por el anticuerpo es de muy baja homología con otros canales (Pardo & Stühmer, 2008a) y si bien, la administración del anticuerpo en animales resultó en una inhibición moderada del crecimiento del tumor, cabe resaltar que estas pruebas se hicieron en animales inmunodeprimidos en donde no se presenta la respuesta inmune ante la presencia de anticuerpos.

Por otro lado, una proteína de fusión que consta de un anticuerpo que reconoce un epítome extracelular de Kv10.1 y el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL), induce la muerte programada de células tumorales positivas a Kv10.1 (Hartung, Stühmer, & Pardo, 2011). Por otro lado, la inhibición de los canales Kv10.1 reduce la migración *in vitro* de células de leucemia (Agarwal et al., 2010), disminuyendo su potencial metastásico.

Finalmente, se plantea que la torreta presente en el canal Kv10.1 es un sitio de glicosilación y que en esta posición, la cadena de azúcar puede rodear la región extracelular del poro y prevenir la unión de toxinas inhibitoras, (Whicher & MacKinnon, 2016). A pesar de ello, ya existen algunos reportes de toxinas que son capaces de inhibir al canal Kv10.1 de manera dependiente de la concentración, tales como κ -hefutoxina (Moreels et al., 2016), APETx4 (Moreels et al., 2017), Aa1a y Ap1a (Ma et al., 2018). Sin embargo, todas ellas presumiblemente actúan sobre el dominio sensor de voltaje para ejercer influencia sobre el dominio del poro.

Justificación

Durante los últimos 20 años, se han buscado nuevos blancos moleculares para tratamientos contra el cáncer. Los canales iónicos son objetivos potenciales, ya que están implicados en la biología del cáncer, se expresan en la superficie celular y existen muchas herramientas farmacológicas para manipularlos. La idea de interferir con la función de los canales de K^+ como estrategia terapéutica para el tratamiento del cáncer no es nueva, sobre todo porque los canales iónicos son accesibles desde el medio extracelular y son blanco de varios tipos de fármacos.

La baja expresión de $K_v10.1$ en tejidos normales fuera del sistema nervioso y la sobreexpresión de $K_v10.1$ en muchos tumores malignos, refuerza la posibilidad de utilizar este canal como blanco de compuestos citotóxicos, disminuyendo o evitando de esta manera los efectos secundarios sobre las células normales.

A pesar de que ya se han descrito algunos compuestos capaces de inhibir al canal $K_v10.1$, ninguno de ellos ha demostrado ser específico, pues también bloquean a HERG, lo que implica un riesgo cardíaco, es por esta razón que resulta imperativa la búsqueda intensiva de agentes moduladores que sean específicos para el canal $K_v10.1$, pues resultaría en la inhibición selectiva de células tumorales.

De esta manera los agentes reguladores específicos del canal $K_v10.1$ que se identifiquen, en combinación con los tratamientos actualmente disponibles, podrían mejorar sustancialmente las terapias actuales y aumentar la esperanza de vida de pacientes con tipos específicos de tumores.

Objetivos

Buscar inhibidores del canal de potasio $K_v10.1$, el cual está implicado en la carcinogénesis de varios tipos de cáncer

Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto de fracciones polipeptídicas del veneno del alacrán *Centruroides noxius* mediante un tamizaje (*screening*) primario, usando un fluoroforo que es sensible a talio (Tl^+), de manera que se puede medir el flujo de Tl^+ a través del canal $K_v10.1$, y así identificar posibles fracciones activas (“hits”)
2. Comprobar el efecto de los “hits” obtenidos en el tamizaje primario con experimentos electrofisiológicos de patch-clamp
3. En caso de encontrar una fracción que inhiba al canal $K_v10.1$, caracterizar el mecanismo de inhibición que la toxina ejerce sobre el canal $K_v10.1$, así como su especificidad

Hipótesis

Se sabe que los venenos de alacrán son una fuente rica de toxinas dirigidas a canales de potasio, esto, aunado a que ya se han reportado toxinas capaces de inhibir al canal $K_v10.1$, debería ser posible que, mediante la evaluación sistemática e intensiva de fracciones polipeptídicas provenientes del veneno del alacrán *Centruroides noxius* se identifique alguna o algunas que interfirieran con la función del canal $K_v10.1$.

Material y Método

Cultivo celular

La línea celular HEK-293 transfectada de manera estable con el canal Kv10.1 (HEK/Kv10.1) (donada por el Dr. Walter Stühmer, Instituto Max-Planck de Medicina Experimental, Göttingen, Alemania) se mantuvo en cultivo a 37°C y 5% CO₂ en medio DMEM (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor (Thermo Scientific) y 30 µg/ml Zeocina (Invitrogen,) como antibiótico de selección.

Tamizaje primario de la actividad de diferentes fracciones sobre el canal Kv10.1 por fluorescencia

Empleando fluorometría automatizada de alto rendimiento (FlexStation3, Molecular Devices) y las células HEK/Kv10.1, se ensayó el efecto de fracciones polipeptídicas, provenientes del veneno del alacrán *Centruroides noxius*, sobre el influjo de Talio (Tl⁺) como ión subrogado permeable a través de distintos canales de K, incluido el Kv10.1, para esto se usó el kit de potasio FLIPR (Molecular Devices®). El porcentaje de bloqueo se determinó en los registros de fluorescencia. Las fracciones con un efecto detectado y reproducible (“hits”) se evaluaron por patch-clamp.

Las células HEK/Kv10.1 se sembraron en placas de 96 pozos (20 000 células/pozo) 24 hrs antes del ensayo en medio completo (descrito en el apartado anterior: Cultivo celular) a 37°C con una atmosfera de 5% CO₂. Una hora previa al experimento, a la placa con una confluencia celular de 90-100% se le cambió el medio por medio DMEM sin SFB (para evitar que el SFB secuestre fluoróforo y tener una mayor sensibilidad), posteriormente las células se incubaron con el fluoróforo durante 1 hr a 37°C (a una dilución 1:1 medio y fluoróforo).

Para la evaluación de las toxinas, las células HEK/Kv10.1 se pre-incubaron durante 5 min a temperatura ambiente con las diferentes fracciones polipeptídicas del veneno de alacrán *Centruroides noxius* a una concentración de [5 µg/ml]. Además, como condiciones control se incubaron 5 minutos con 10 µM de mibefradil, y 5 µM de amiloradona, para cada condición experimental se usaron pozos diferentes.

Los cambios en la intensidad de fluorescencia se registraron en el lector multi-modal de placa FlexStation3® (Molecular Devices), utilizando el software SoftMax® Pro, adquiriendo la señal fluorescente a una longitud de onda (λ) de emisión de 538 nm, y una λ de excitación de 485 nm cada 2 segundos durante 200 segundos, haciendo el estímulo con 60 mM K⁺/2mM TI⁺ a los 20 segundos en el modo de lectura *flex*.

Registros electrofisiológicos con la técnica de Patch-clamp

Los registros electrofisiológicos se hicieron con la técnica de *patch clamp* en su configuración de célula completa (*whole-cell*) usando un amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices), las corrientes se filtraron con el filtro Bessel incorporado del amplificador con una frecuencia de 5 kHz y se muestreo con una interfaz Digidata 1550 a 25 kHz. Los registros se analizaron con Clampfit 10.4.

Los electrodos de registro se hicieron de vidrio de borosilicato (World Precision Instruments) con resistencias en el intervalo de 4-8 MΩ. La solución interna contenía (mM): 140 KCl, 1 MgCl₂, 5 EGTA y 10 HEPES, el pH se ajustó a 7.2 con KOH. La solución externa contuvo (mM): 135 NaCl, 5.4 KCl, 2 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 10 Glucosa, 2 TEA y 10 HEPES, el pH se ajustó a 7.4 con NaOH. El voltaje de mantenimiento fue de -70 mV. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente.

Resultados

En la presente tesis se abordó la búsqueda de moduladores del canal $K_v10.1$ partiendo de fracciones aisladas por HPLC del veneno del alacrán *Centruroides noxius*; al contar con una gran cantidad de fracciones polipeptídicas se inició con un tamizaje primario a partir del cual se obtuvieron los compuestos de interés para posteriormente evaluarlos con la técnica de patch-clamp.

Tamizaje (*screening*) primario

La evaluación se hizo utilizando el kit de potasio FLIPR (Molecular Devices®). Este ensayo aprovecha la permeabilidad del Tl^+ a través de los canales de potasio sensibles a voltaje; la cual es bien conocida, se tiene una relación $P_{Tl}:P_K$ de 2.3:1.00 (Hille, 1973). Este kit usa un novedoso fluorocromo altamente sensible a Tl^+ , que produce señal fluorescente ante su unión a Tl^+ . El fluorocromo tiene un grupo acetometilo (AM) que permite su permeabilidad a las células a través de difusión pasiva y, ya en el citoplasma, las esterasas cortan el grupo AM liberando el fluorocromo en su forma sensible a Tl^+ . El fluorocromo produce una señal fluorescente ante la unión al Tl^+ transportado a través de los canales de potasio, siendo la intensidad de fluorescencia proporcional al flujo de Tl^+ , y éste a su vez al número de canales activados. Por lo tanto, éste ensayo proporciona un indicador funcional de la actividad de los canales $K_v10.1$ presentes en las células. El kit tiene un compuesto que apaga la señal fluorescente fuera de la célula, lo que permite realizar el ensayo sin necesidad de quitar o lavar el exceso de fluorocromo. Para activar los canales de potasio, las células se estimularon con una mezcla de K_2SO_4 y Tl_2SO_4 .

En total se evaluaron 39 fracciones polipeptídicas aisladas por HPLC del veneno del alacrán *Centruroides noxius*. Los trazos de la intensidad de fluorescencia se normalizaron respecto al control (**Figura 5**); a todos estos trazos se les restó la intensidad de fluorescencia del control negativo que corresponde al

estímulo sólo con Talio ($0K^+/2TI^+$) (**Anexo 1**). Los resultados del cambio en la intensidad de fluorescencia en ausencia (Control) o presencia de las fracciones polipeptídicas se reportan como el promedio de la intensidad máxima registrada después del estímulo con 30 mM $K_2SO_4/1$ mM Tl_2SO_4 normalizado respecto al control.

Inicialmente se evaluaron 12 fracciones, de las cuales ninguna mostró tener un efecto significativo sobre el influjo de Tl^+ , mientras que el mibefradil y la amiodarona (control positivo) si disminuyeron significativamente la intensidad de fluorescencia (**Figura 6**).

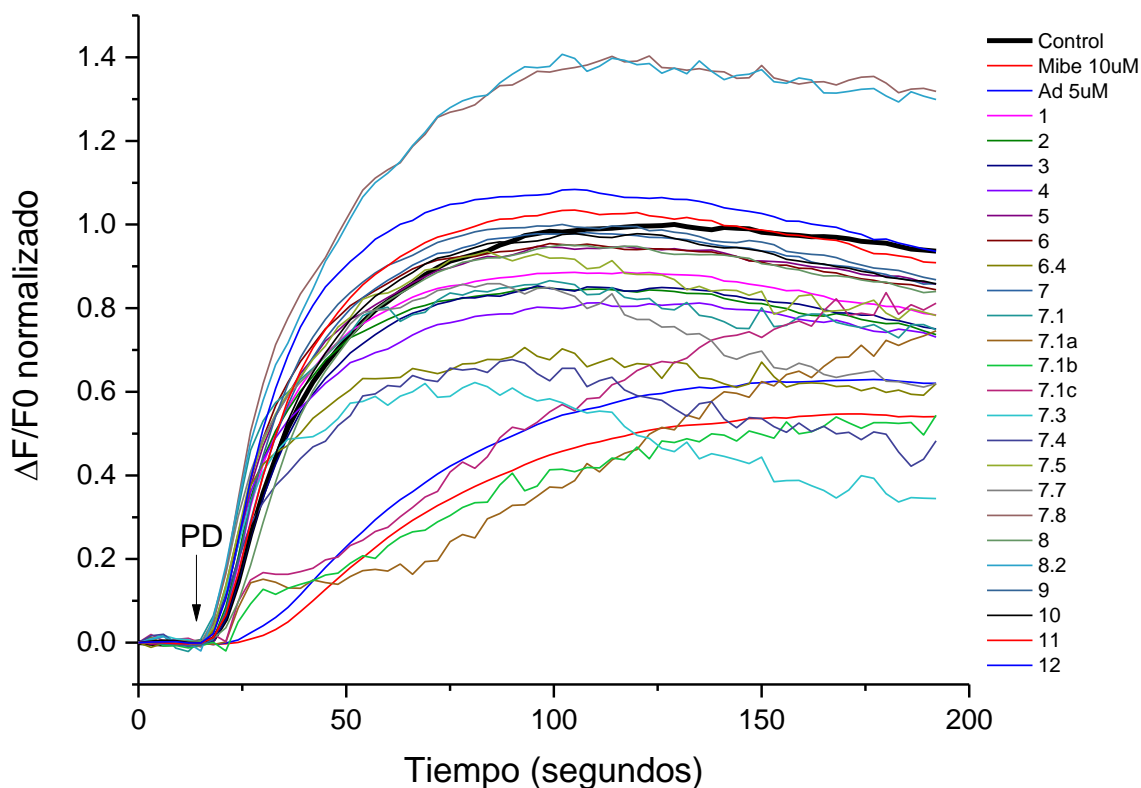


Figura 5. Efecto de las fracciones polipeptídicas aisladas del veneno del alacrán *Centruroides noxius*. Trazos representativos de la intensidad de fluorescencia normalizada registrada en células HEK/ $K_v10.1$ en condiciones control y en presencia de distintos compuestos: Mibefradil (10 μ M), Amiodarona (5 μ M) y distintas fracciones polipeptídicas (5 μ g/ml) a excepción de las fracciones 7.1a, b y c que se evaluaron a una concentración de 0.7 μ g/ml. La indicación PD se refiere al pulso despolarizante con 30 mM

$K_2SO_4/1$ mM Tl_2SO_4 , lo que provoca que se abran los canales sensibles a voltaje y por lo tanto haya entrada de Tl^+ y consecuentemente un aumento en la intensidad de fluorescencia.

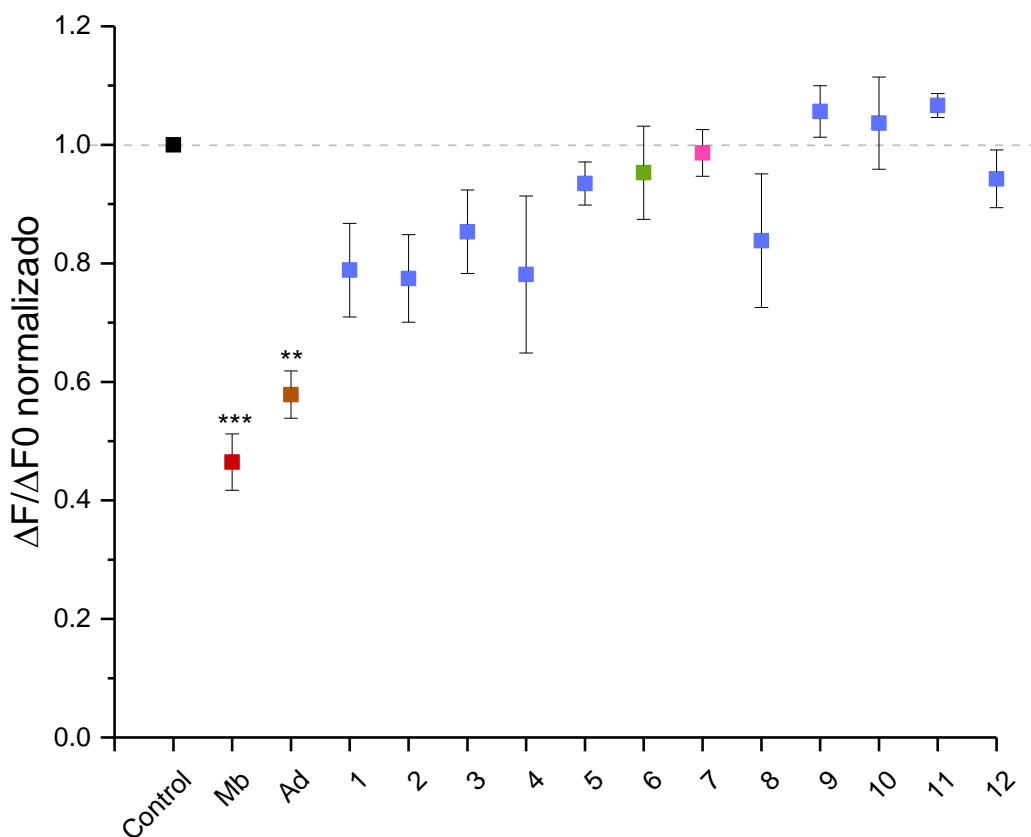


Figura 6. Efecto de 12 fracciones polipeptídicas aisladas del veneno del alacrán *Centruroides noxius*. Intensidad de fluorescencia máxima inducida observada después del pulso despolarizante normalizada respecto a la condición de control de 12 fracciones polipeptídicas diferentes. Los puntos representan el promedio \pm sem de 3 experimentos independientes, cada uno por duplicado. El mibefradil (Mb) y la amiodarona (Ad) disminuyeron significativamente la intensidad de fluorescencia máxima, mientras que ninguna de las fracciones tuvo un efecto significativo sobre el influjo de Tl^+ .

Posteriormente se refraccionaron las fracciones 6 y 7 debido a que se sabe que en ese rango de tiempos de retención se suelen encontrar las toxinas dirigidas a los canales de potasio, resultando 27 nuevas fracciones, las cuales se evaluaron con el mismo ensayo de fluorescencia.

De la misma manera, ninguna de las fracciones evaluadas mostró disminuir el influjo de TI^+ , mientras que el mibefradil y la amiodarona redujeron significativamente la intensidad de fluorescencia (**Figura 7**).

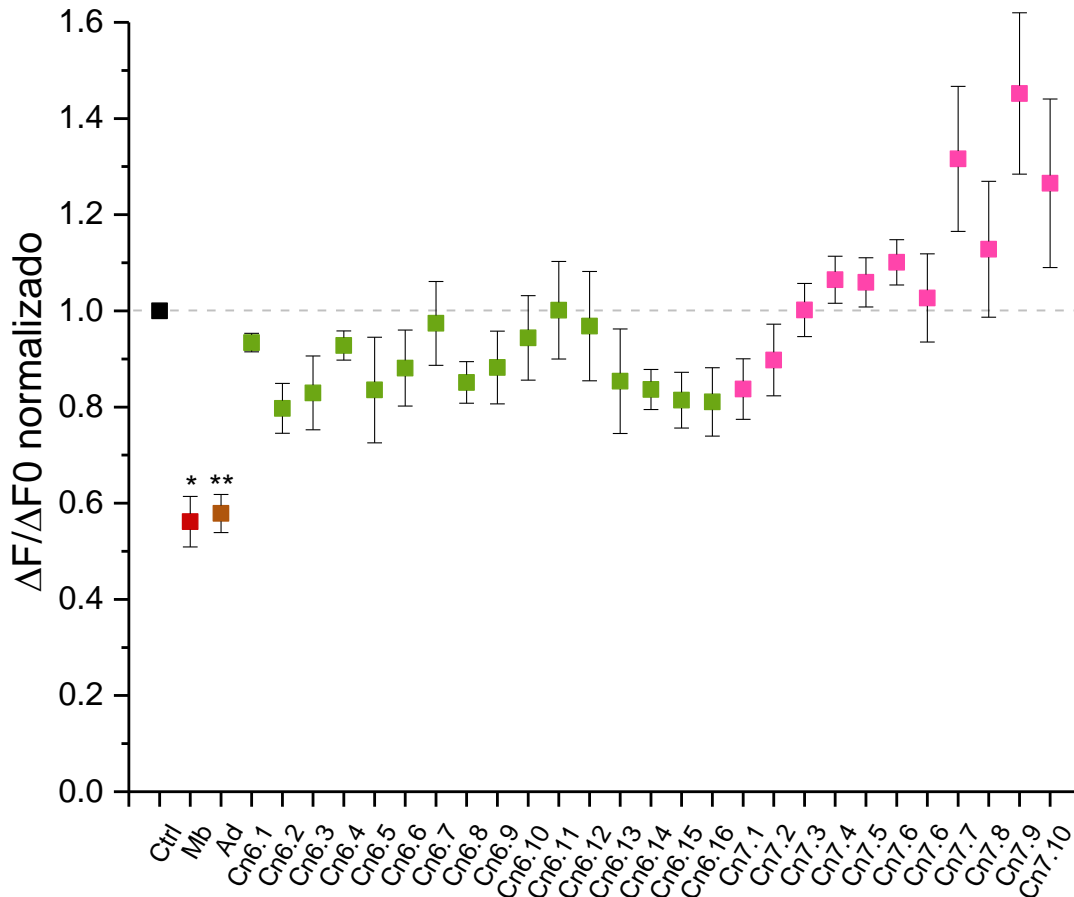


Figura 7. Efecto de las fracciones polipeptídicas aisladas del veneno del alacrán *Centruroides noxius*. Intensidad de fluorescencia máxima inducida observada después del pulso despolarizante normalizada respecto a la condición de control de 27 fracciones polipeptídicas diferentes. Los puntos representan el promedio \pm sem de 3 experimentos independientes, cada uno por duplicado. Tanto el mibefradil como la amiodarona mostraron disminuir significativamente la intensidad de fluorescencia máxima, ninguna de las fracciones polipeptídicas disminuyó significativamente el influjo de TI^+ .

A continuación, se hicieron experimentos de patch-clamp para dar más seguridad a los resultados obtenidos en el tamizaje primario.

Electrofisiología

Inicialmente se evaluó el efecto de la solución extracelular (SEC), para descartar cualquier efecto mecánico que pudiese tener el sistema de perfusión o el picospritzer. Para obtener las curvas corriente-voltaje (IV), las corrientes iónicas se generaron mediante un protocolo de comandos de voltaje escalonados de -100 a 50 mV con $\Delta V=10$ mV. Además, se obtuvo el curso temporal del efecto de la SEC mediante un comando fijo a +50 mV con repeticiones cada 5 segundos. El porcentaje de cambio se determinó directamente de los registros obtenidos con el protocolo de comando fijo a +50 mV. Como se esperaba la SEC no provocó un cambio significativo en la corriente generada por el canal Kv10.1 (**Figura 8**).

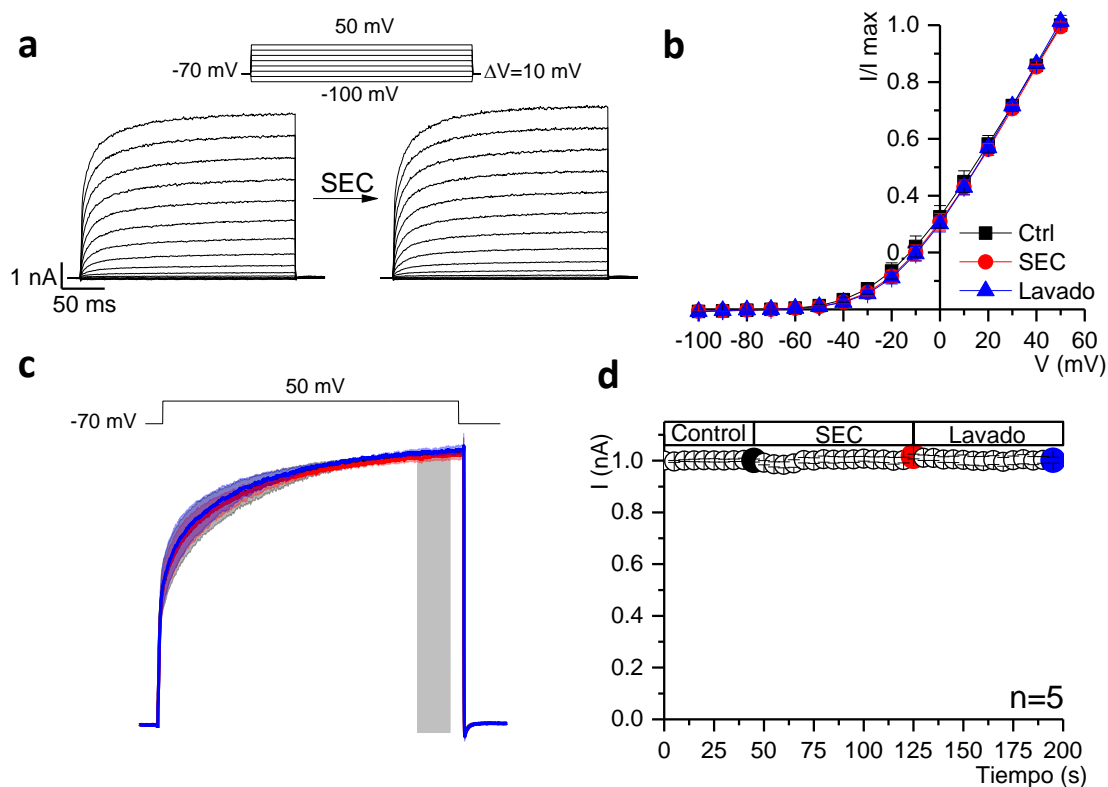


Figura 8. Efecto de la SEC sobre la corriente generada por Kv10.1. a) Se muestran trazos representativos de las corrientes de potasio registradas antes (control) y después de la adición de SEC. Las corrientes se obtuvieron con un protocolo de comandos de voltaje escalonados de -100 a +50 mV con un ΔV de 10 mV, el voltaje de mantenimiento fue de -

70 mV. **b)** Curvas corriente-voltaje (IV), **c)** Trazos promedio con sus errores estándar de la corriente normalizada generada por un comando fijo a +50 mV en condiciones control y ante la adición de SEC después de 150 segundos, **d)** curso temporal del efecto de la SEC, se grafica el promedio de la corriente sombreada en el inciso c, (n=5).

Posteriormente se evaluaron 13 fracciones polipeptídicas aisladas por HPLC del veneno del alacrán *Centruroides noxius*, incluyendo la fracción 10, la cual no mostró cambios significativos en la amplitud de corriente (**Figura 9**) correspondiendo con los resultados del tamizaje primario.

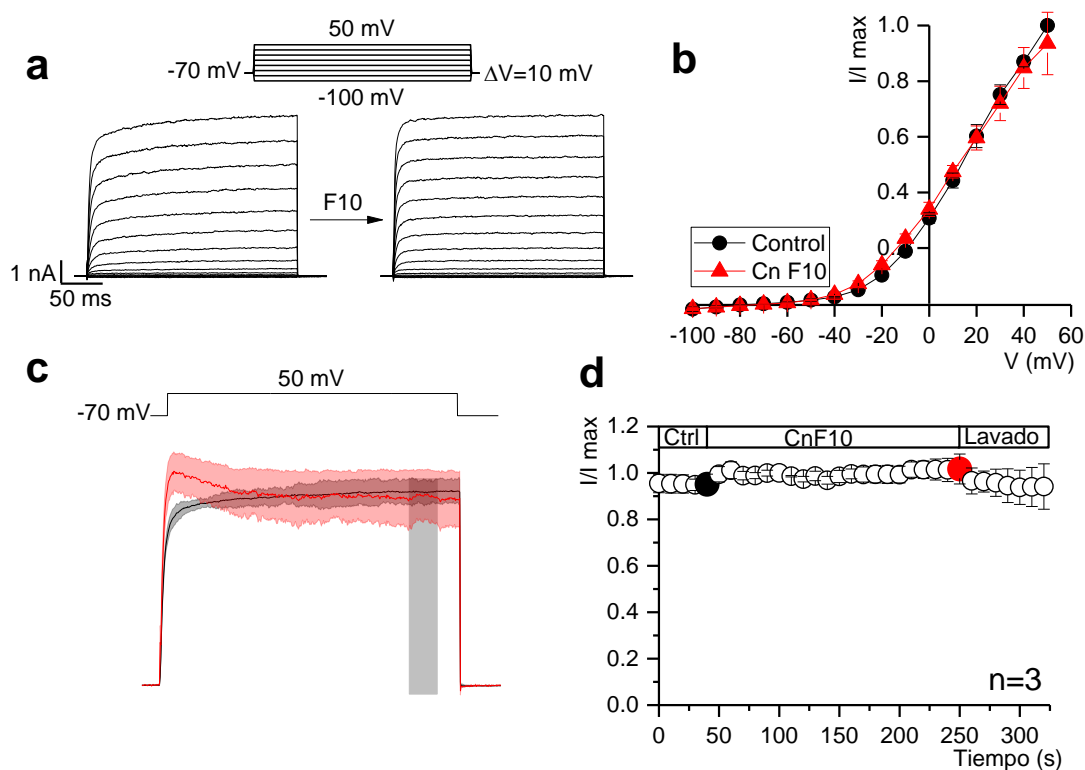


Figura 9. Efecto de la fracción CnF10 sobre la corriente generada por Kv10.1. a) Se muestran trazos representativos de las corrientes de potasio registradas antes (control) y después de la adición de 5 μM de CnF10. Las corrientes se obtuvieron con un protocolo de comandos de voltaje escalonados de -100 a +50 mV con un ΔV de 10 mV, el voltaje de mantenimiento fue de -70 mV. **b)** Curvas corriente-voltaje (IV), **c)** Trazos promedio con sus errores estándar de la corriente normalizada generada por un comando fijo a +50 mV en condiciones control y ante la adición de la fracción CnF10 después de 150 segundos, **d)**

curso temporal del efecto de la fracción CnF10, se grafica el promedio de la corriente sombreada en el inciso c, ($n=3$).

Además, se evaluó la fracción CnF7 a pesar de no disminuir el influjo de talio (Figura 6) pues se consideró que podría incluir fracciones dirigidas a canales de potasio, sin embargo, la ausencia de efecto de la fracción CnF7 se corroboró en los experimentos de patch-clamp (Figura 10), ya que la adición de CnF7 no cambio significativamente la amplitud de la corriente, ni la relación corriente-voltaje.

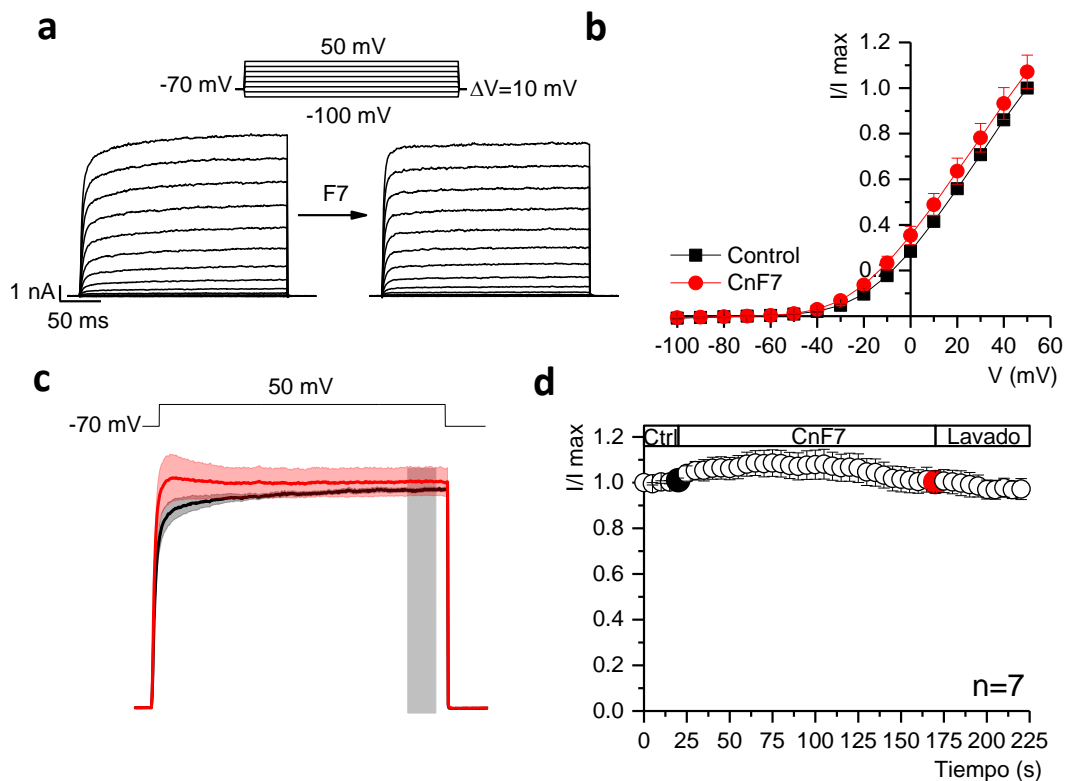


Figura 10. Efecto de la fracción CnF7 sobre la corriente generada por Kv10.1. a) Se muestran trazos representativos de las corrientes de potasio registradas antes (control) y después de la adición de 5 μM de CnF7. Las corrientes se obtuvieron con un protocolo de comandos escalonados de -100 a +50 mV con un ΔV de 10 mV, el voltaje de mantenimiento fue de -70 mV. **b)** Curvas corriente-voltaje (IV), **c)** Trazos promedio con sus errores estándar de la corriente normalizada generada por un comando fijo a +50 mV en condiciones control (trazo negro) y ante la adición de la fracción CnF7 después de 150 segundos (trazo rojo),

d) curso temporal del efecto de la fracción CnF7, se grafica el promedio de la corriente sombreada en el inciso c, (n=7).

A continuación, se evaluaron una serie de fracciones obtenidas a partir del refaccionamiento de la fracción CnF7, todas las corrientes se generaron con un comando de voltaje a +50 mV, antes y después de la adición de 5 μ M de las distintas fracciones polipeptídicas, del mismo modo ninguna mostró provocar un cambio significativo sobre la corriente generada por el canal Kv10.1 (**Figura 11**).

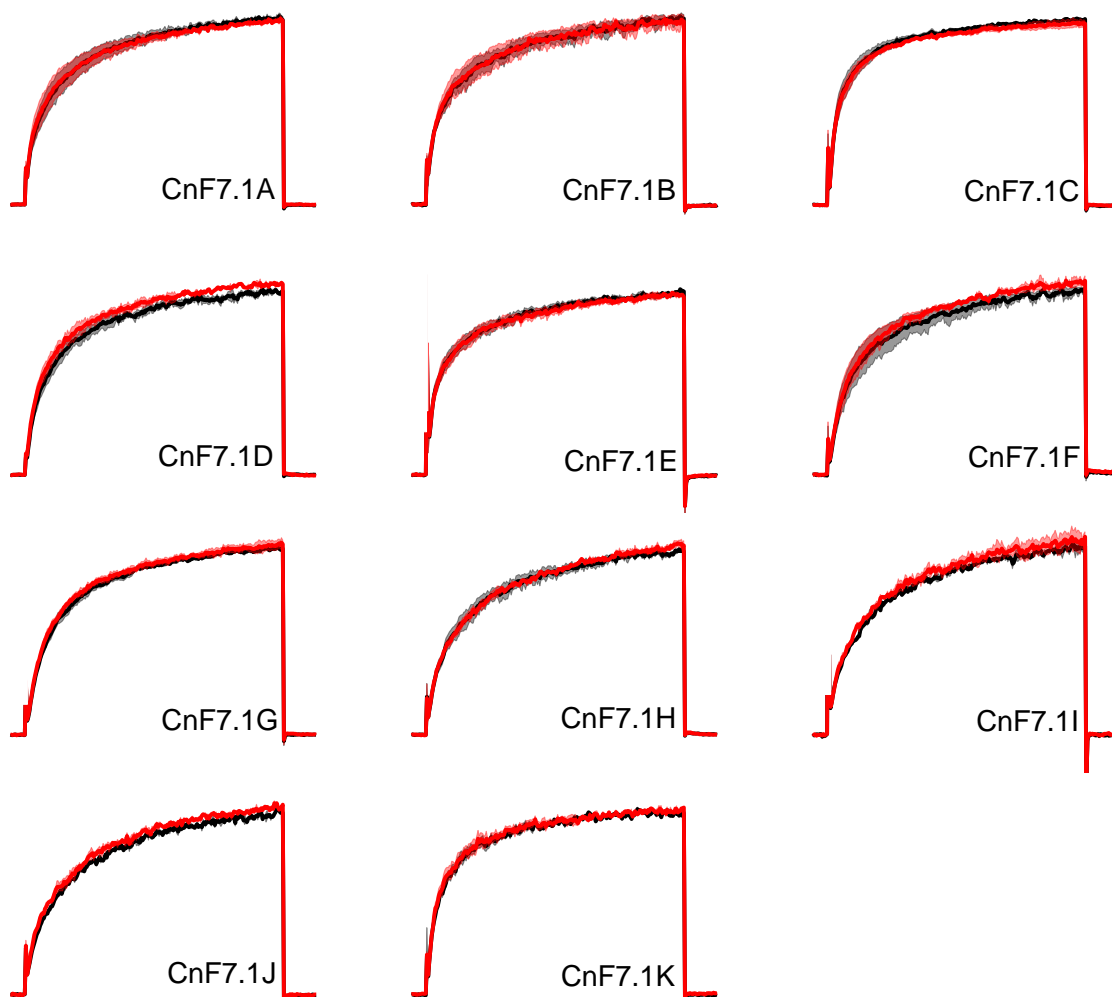


Figura 11. Efecto de diferentes fracciones polipeptídicas sobre la corriente generada por el canal Kv10.1. Trazos promedio con sus errores estándar de la corriente normalizada generada por un comando fijo a +50 mV en condiciones control (trazo negro) y ante la

adición de distintas fracciones después de 150 segundos (trazo rojo) a una concentración de 5 μ M.

Discusión

El presente trabajo abordó la búsqueda de agentes que pudieran interferir con la función del canal $K_v10.1$, específicamente, se evaluaron fracciones polipéptidicas derivadas del veneno del alacrán *Centruroides noxius*, pues se sabe que el veneno de los alacranes es rico en péptidos capaces de bloquear canales, en particular se sabe que los péptidos de cadena corta (más pequeños que 75 residuos de aminoácidos (aa)) son generalmente moduladores de canales de potasio, además algunos de ellos pueden llegar a ser muy específicos a ciertos canales (King, 2015).

Resulta interesante que hasta el año 2015 todavía no se había identificado alguna toxina capaz de modular la actividad de este canal, pero sí se habían reportado compuestos pequeños capaces de modularla, tales como el astemizol (García-Quiroz et al., 2014), Imipramina (Gavrilova-Ruch et al., 2002), mibefradil (Gómez-Lagunas et al., 2017) y amiodarona (Barriga-Montoya et al., 2018), incluso se abordó el desarrollo de un anticuerpo dirigido hacia este canal (Gómez-Varela et al., 2007), pero ninguna toxina se había reportado como inhibidora del mismo.

En el año 2016 se dio a conocer la estructura cristalográfica del canal $K_v10.1$ (Whicher & MacKinnon, 2016), donde se puede observar que el canal tiene una torreta que rodea al poro del lado extracelular y se plantea que esta contiene sitios de glicosilación, de manera que en esa posición la cadena de azúcar podría prevenir la unión de toxinas bloqueadoras, lo cual podría explicar el por qué había resultado tan difícil encontrar toxinas que modularan a este canal. Sin embargo, ese mismo año se dio a conocer la primera toxina descrita como inhibidor del canal $K_v10.1$, la κ -hefutoxina (Moreels et al., 2016), la cual a pesar de mostrar muy poca afinidad ($IC_{50} \sim 26 \mu$ M), mostró tener un efecto dependiente de la concentración.

κ -hefutoxina es un péptido aislado del veneno del alacrán *Heterometrus fulvipes* y consta de 22 residuos de aa, tiene dos puentes disulfuro y contiene los residuos funcionales de la díada Tyr5 y Lys19, la cual se conserva en muchos moduladores de canales de potasio, de manera que la cadena lateral cargada positivamente del residuo de lisina podría entrar en el poro y unirse a un residuo del canal cargado negativamente, es decir, esta lisina actuaría como un catión sustituto y formaría un tapón en la región del poro, lo que ocluiría físicamente la vía de conducción de iones (Banerjee et al., 2013). El papel crucial de la díada Tyr5 y Lys19 se comprobó evaluando análogos de κ -hefutoxina, pues al no contar con estos residuos de aa, la afinidad disminuyó considerablemente (Moreels et al., 2016).

Por otro lado, en el 2017, se publicó la segunda toxina capaz de modular al canal $K_v10.1$, APETx4 (Moreels et al., 2017), aislada del veneno de la anémona marina *Anthopleura elegantissima*, está compuesta por 42 residuos de aa, tiene 3 puentes disulfuro y mostró ser más afín que la κ -hefutoxina pues tuvo una IC_{50} de 1.1 μ M y además desplazó la curva de activación hacia potenciales más positivos favoreciendo el estado cerrado del canal, es decir, modifica la dependencia del voltaje uniéndose al canal en estado cerrado y reduciendo la tasa de activación. De manera que APETx4 actúa como un modificador de la activación del canal, es decir, se une al dominio sensible a voltaje, a diferencia de κ -hefutoxina, que parece ser un bloqueador del poro.

Finalmente, las últimas toxinas que se reportaron como inhibidores del canal $K_v10.1$ fueron aisladas del veneno de las tarántulas *Avicularia aurantiaca* y *Avicularia purpurea* (Ma et al., 2018), denominadas Aa1a y Ap1a, ambos péptidos constan de 36 residuos de aa, con seis cisteínas y extremos carboxilo aminados, además de presentar un motivo inhibidor del nudo de cistina (INC). Ap1a inhibió la corriente de $K_v10.1$ con un IC_{50} de 236 nM, mientras que Aa1a tuvo una IC_{50} de 637 nM, siendo ambas más potentes que las toxinas reportadas anteriormente como inhibidores del canal $K_v10.1$. Ambos péptidos cambian la dependencia del voltaje de activación del canal en dirección despolarizante, como consecuencia ambos

péptidos redujeron significativamente la probabilidad de apertura, se sugiere que estas toxinas se unen en regiones extracelulares del dominio de detección de voltaje.

Dados los sitios de glicosilación presentes en la torreta extracelular del canal Kv10.1, no es de extrañar que las toxinas que apuntan a ser modificadoras de la activación resultaron ser mucho más potentes que κ -hefutoxina que parece ser una bloqueadora del poro, del mismo modo, es posible que las toxinas que se evaluaron en este trabajo no se dirigieran al dominio sensible a voltaje, por lo cual no se lograron identificar toxinas inhibitoras del canal Kv10.1, pues si bien los venenos de alacrán son la principal fuente de moduladores de canales de K^+ , se sabe que todos son bloqueadores de poros (Kuzmenkov, Grishin, & Vassilevski, 2015), por lo que no es de sorprender que en el presente trabajo no se hayan identificado toxinas que modularan la actividad de Kv10.1.

Actualmente, con la información obtenida a partir de la estructura cristalográfica del canal Kv10.1, sumada a los importantes avances que se han hecho sobre los cambios funcionales que provocan algunas toxinas en este, se podría abordar una búsqueda mejor planeada de polipéptidos que interfieran con la función de Kv10.1, que incluya toxinas cuya estructura esté bien estudiada y compartan los motivos estructurales importantes que se han reportado; tales como la presencia de 3 puentes disulfuro; o bien, se podrían diseñar polipéptidos más afines y selectivos a partir de los que ya se han reportado.

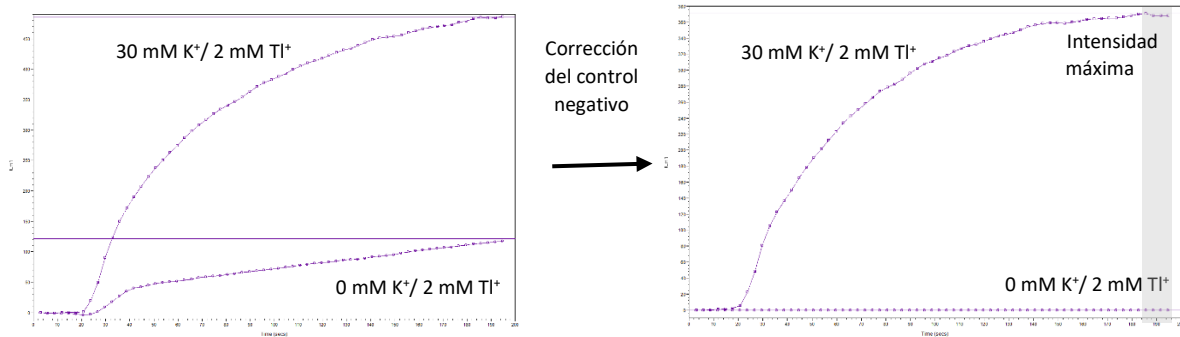
Conclusiones

Los venenos son una fuente particularmente rica de moduladores de canales iónicos y, además de representar una excelente herramienta para estudiar las propiedades biofísicas y farmacológicas de los canales iónicos, resultan de significativo interés, pudiendo obtenerse moduladores de gran eficacia y selectividad, tales como Vm24 (Varga et al., 2012) y moka1 (Takacs et al., 2009), moduladores específicos del canal $K_v1.3$, por mencionar algunos. Por lo que un tamizaje primario que permita la identificación de potenciales agentes activos en un periodo de tiempo relativamente corto representaría un impulso para encontrar nuevos moduladores de canales iónicos con potencial terapéutico. En este caso la medición del flujo de talio representó un buen método para hacer un tamizaje primario, pues se lograron evaluar 53 fracciones polipeptídicas en un tiempo muy corto y, además, los resultados arrojados por el tamizaje primario coincidieron con los obtenidos mediante patch-clamp.

Desafortunadamente no se lograron identificar fracciones que interfirieran con la función del canal $K_v10.1$, lo cual no es de extrañar, pues la estructura de este dificulta la unión de toxinas bloqueadoras.

Aunque este trabajo se enfocó a la búsqueda de toxinas que inhibieran a $K_v10.1$ motivados por su presencia en distintos tumores cancerígenos, actualmente se sabe que la ganancia de función de este canal también está implicado en desordenes neuronales como la epilepsia, esto hace que el estudio de la estructura, mecanismo de acción y la búsqueda de moduladores de éste canal sea una tarea importante en la investigación.

Anexo



Anexo 1. Corrección de la intensidad máxima. Ejemplo representativo de la corrección realizada a los trazos experimentales control que consiste en restar la intensidad del control negativo (0 mM K⁺/2 mM TI⁺).

Referencias

- Agarwal, J. R., Griesinger, F., Stühmer, W., & Pardo, L. A. (2010). The potassium channel Ether à go-go is a novel prognostic factor with functional relevance in acute myeloid leukemia. *Molecular Cancer*, *9*, 18. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-18>
- Asher, V., Khan, R., Warren, A., Shaw, R., Schalkwyk, G. V., Bali, A., & Sowter, H. M. (2010). The Eag potassium channel as a new prognostic marker in ovarian cancer. *Diagnostic Pathology*, *5*(1), 78. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-5-78>
- Banerjee, A., Lee, A., Campbell, E., & Mackinnon, R. (2013). Structure of a pore-blocking toxin in complex with a eukaryotic voltage-dependent K(+) channel. *ELife*, *2*, e00594. <https://doi.org/10.7554/eLife.00594>
- Barriga-Montoya, C., Huanosta-Gutiérrez, A., Reyes-Vaca, A., Hernández-Cruz, A., Picones, A., & Gómez-Lagunas, F. (2018). Inhibition of the K⁺ conductance and Cole-Moore shift of the oncogenic Kv10.1 channel by amiodarone. *1*, 491–503.
- Bijlenga, P., Occhiodoro, T., Liu, J., Bader, C. R., Bernheim, L., & Fischer-lougheed, J. (1998). Rapid Report.
- Brüggemann, A., Stühmer, W., & Pardo, L. A. (1997a). Mitosis-promoting factor-mediated suppression of a cloned delayed rectifier potassium channel expressed in *Xenopus* oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(2), 537–42. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.2.537>
- Brüggemann, A., Stühmer, W., & Pardo, L. A. (1997b). Mitosis-promoting factor-mediated suppression of a cloned delayed rectifier potassium channel expressed in *Xenopus* oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(2), 537–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9012819>
- Camacho, J., Sánchez, A., Stühmer, W., & Pardo, L. A. (2000). Cytoskeletal interactions determine the electrophysiological properties of human EAG potassium channels. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, *441*(2–3), 167–74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11211100>

- Crociani, O., Guasti, L., Balzi, M., Becchetti, A., Wanke, E., Olivotto, M., ... Arcangeli, A. (2003). Cell cycle-dependent expression of HERG1 and HERG1B isoforms in tumor cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(5), 2947–2955. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210789200>
- de Queiroz, F. M., Suarez-Kurtz, G., Stühmer, W., & Pardo, L. A. (2006). Ether à go-go potassium channel expression in soft tissue sarcoma patients. *Molecular Cancer*, 5, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-5-42>
- 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(52), 36234–40. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801830200>
- Farias, L. M. B., Ocaña, D. B., Díaz, L., Larrea, F., Avila-Chávez, E., Cadena, A., ... Camacho, J. (2004). Ether a go-go potassium channels as human cervical cancer markers. *Cancer Research*, 64(19), 6996–7001. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1204>
- García-Quiroz, J., García-Becerra, R., Santos-Martínez, N., Barrera, D., Ordaz-Rosado, D., Avila, E., ... Díaz, L. (2014). In vivo dual targeting of the oncogenic Ether-à-go-go-1 potassium channel by calcitriol and astemizole results in enhanced antineoplastic effects in breast tumors. *BMC Cancer*, 14(1), 745. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-745>
- Gavrilova-Ruch, O., Schönherr, K., Gessner, G., Schönherr, R., Klapperstück, T., Wohlrab, W., & Heinemann, S. H. (2002). Effects of imipramine on ion channels and proliferation of IGR1 melanoma cells. *The Journal of Membrane Biology*, 188(2), 137–49. <https://doi.org/10.1007/s00232-001-0181-3>
- Golovina, V. A., Platoshyn, O., Bailey, C. L., Wang, J., Limsuwan, A., Sweeney, M., ... Trp, U. (2001). Upregulated TRP and enhanced capacitative Ca²⁺ entry in human pulmonary artery myocytes during proliferation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 746–755. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.2.H746>
- 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*. <https://doi.org/10.1002/jcp.25448>
- Gómez-Varela, D., Zwick-Wallasch, E., Knötgen, H., Sánchez, A., Hettmann, T., Ossipov, D., ...

- 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>
- González, C., Baez, D., Valencia, I., Oyarzún, I., Rojas, P., Naranjo, D., & Latorre, R. (2012). K⁺ Channels : Function-Structural Overview. *Comprehensive Physiology*, *2*(July), 2087–2149.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c110047>
- Haitin, Y., Carlson, A. E., & Zagotta, W. N. (2013). The structural mechanism of KCNH-channel regulation by the eag domain. *Nature*, *501*(7467), 444–8.
<https://doi.org/10.1038/nature12487>
- Hartung, F., Stühmer, W., & Pardo, L. a. (2011). Tumor cell-selective apoptosis induction through targeting of KV10.1 via bifunctional TRAIL antibody. *Molecular Cancer*, *10*(1), 109.
<https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-109>
- Hille, B. (1973). Potassium Channels in Myelinated Nerve. *The Journal of General Physiology*, *61*(6), 669–686.
- Kaczmarek, L. K. (2006). Non-conducting functions of voltage-gated ion channels. *NATURE REVIEWS | NEUROSCIENCE*, *7*, 761–771. <https://doi.org/10.1038/nrn1988>
- Kalia, J., Milescu, M., Salvatierra, J., Wagner, J., Klint, J. K., King, G. F., ... Bosmans, F. (2016). From foe to friend: using animal toxins to investigate ion channel function. *Kalia, J., Milescu, M., Salvatierra, J., Wagner, J., Klint, J. K., King, G. F., ... Bosmans, F. (2016). From Foe to Friend: Using Animal Toxins to Investigate Ion Channel Function. Journal of Molecular Biology*, *427*(1), 158–175. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.07.027>.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.07.027>.From
- King, G. F. (Ed.). (2015). *Venoms to Drugs* (Royal Soci).
- Kuzmenkov, A. I., Grishin, E. V, & Vassilevski, A. A. (2015). Diversity of Potassium Channel Ligands : Focus on Scorpion Toxins, *80*(13).
- Li-Smerin, Y., & Swartz, K. J. (1998). Gating modifier toxins reveal a conserved structural motif in voltage-gated Ca²⁺ and K⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(15), 8585–8589. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.8585>

- Long, S. B., Campbell, E. B., & Mackinnon, R. (2005a). Crystal Structure of a Mammalian Voltage-Dependent Shaker Family K⁺ Channel. *Science*, *309*(5736), 897–903.
<https://doi.org/10.1126/science.1116269>
- Long, S. B., Campbell, E. B., & Mackinnon, R. (2005b). Voltage Sensor of Kv1.2: Structural Basis of Electromechanical Coupling. *Science*, *309*(5736), 903–908.
<https://doi.org/10.1126/science.1116270>
- Long, S. B., Tao, X., Campbell, E. B., & MacKinnon, R. (2007). Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature*, *450*(7168), 376–382.
<https://doi.org/10.1038/nature06265>
- Ludwig, J., Terlau, H., Wunder, F., Brüggemann, A., Pardo, L. A., Marquardt, A., ... Pongs, O. (1994). Functional expression of a rat homologue of the voltage gated ether à go-go potassium channel reveals differences in selectivity and activation kinetics between the Drosophila channel and its mammalian counterpart. *The EMBO Journal*, *13*(19), 4451–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7925287>
- Ludwig, J., Weseloh, R., Karschin, C., Liu, Q., Netzer, R., Engeland, B., ... Pongs, O. (2000). Cloning and functional expression of rat eag2, a new member of the ether-a-go-go family of potassium channels and comparison of its distribution with that of eag1. *Molecular and Cellular Neurosciences*, *16*(1), 59–70. <https://doi.org/10.1006/mcne.2000.0851>
- Ma, L., Chin, Y. K. Y., Dekan, Z., Herzig, V., Yuen Chow, C., Heighway, J., ... King, G. F. (2018). Novel venom-derived inhibitors of the human EAG channel, a putative antiepileptic drug target. *Biochemical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.08.038>
- MacKinnon, R., & Miller, C. (1988). Mechanism of charybdotoxin block of the high-conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channel. *The Journal of General Physiology*, *91*(3), 335–49. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2454283>
- Mello de Queiroz, F., Suarez-Kurtz, G., Stühmer, W., & Pardo, L. a. (2006). Ether à go-go potassium channel expression in soft tissue sarcoma patients. *Molecular Cancer*, *5*, 42.
<https://doi.org/10.1186/1476-4598-5-42>
- Milescu, M., Bosmans, F., Lee, S., Alabi, A. A., Kim, J. Il, & Swartz, K. J. (2009). Interactions between lipids and voltage sensor paddles detected with tarantula toxins. *Nature Structural &*

Molecular Biology, 16(10), 1080–5. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1679>

Morais-Cabral, J. H., & Robertson, G. A. (2015). The Enigmatic Cytoplasmic Regions of KCNH Channels. *Journal of Molecular Biology*, 427(1), 67–76.

<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.08.008>

Morais Cabral, J. H., Lee, A., Cohen, S. L., Chait, B. T., Li, M., & Mackinnon, R. (1998). Crystal structure and functional analysis of the HERG potassium channel N terminus: a eukaryotic PAS domain. *Cell*, 95(5), 649–55. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9845367>

Moreels, L., Peigneur, S., Galan, D. T., De Pauw, E., Béress, L., Waelkens, E., ... Tytgat, J. (2017). APETx4, a novel sea anemone toxin and a modulator of the cancer-relevant potassium channel KV10.1. *Marine Drugs*, 15(9), 1–17. <https://doi.org/10.3390/md15090287>

Moreels, L., Peigneur, S., Yamaguchi, Y., Vriens, K., Waelkens, E., Zhu, S., ... Tytgat, J. (2016). Expanding the pharmacological profile of κ -hefutoxin 1 and analogues: A focus on the inhibitory effect on the oncogenic channel Kv10.1. *Peptides*, 1–8.

<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.08.008>

Ousingsawat, J., Spitzner, M., Puntheeranurak, S., Terracciano, L., Tornillo, L., Bubendorf, L., ... Schreiber, R. (2007). Expression of voltage-gated potassium channels in human and mouse colonic carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 13(3), 824–831. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1940>

Pardo, L. A., Brüggemann, A., Camacho, J., & Stühmer, W. (1998). Cell cycle-related changes in the conducting properties of r-eag K⁺ channels. *Journal of Cell Biology*, 143(3), 767–775.

<https://doi.org/10.1083/jcb.143.3.767>

Pardo, L. A., del Camino, D., Sánchez, A., Alves, F., Brüggemann, A., Beckh, S., & Stühmer, W. (1999). Oncogenic potential of EAG K(+) channels. *The EMBO Journal*, 18(20), 5540–7.

<https://doi.org/10.1093/emboj/18.20.5540>

Pardo, L. A., & Stühmer, W. (2006). The roles of K⁺ channels in cancer. *NATURE REVIEWS / NEUROSCIENCE*, 7, 761–771. <https://doi.org/10.1038/nrc3635>

Pardo, L. A., & Stühmer, W. (2008a). Eag1: An emerging oncological target. *Cancer Research*, 68(6), 1611–1613. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5710>

- Pardo, L. A., & Stühmer, W. (2008b). Eag1: An emerging oncological target. *Cancer Research*.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5710>
- Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N., & Catterall, W. A. (2011). The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature*, *475*(7356), 353–358. <https://doi.org/10.1038/nature10238>
- Semenza, G. L. (1998). Hypoxia-inducible factor 1 and the molecular physiology of oxygen homeostasis. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *131*(3), 207–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9523843>
- Spitzner, M., Ousingsawat, J., Scheidt, K., Kunzelmann, K., & Schreiber, R. (2007). Voltage-gated K⁺ channels support proliferation of colonic carcinoma cells. *The FASEB Journal*, 35–44.
<https://doi.org/10.1096/fj.06-6200com>
- Swartz, K. J. (2007). Tarantula toxins interacting with voltage sensors in potassium channels. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, *49*(2), 213–30.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.09.024>
- Takacs, Z., Toups, M., Kollwe, A., Johnson, E., Cuello, L. G., Driessens, G., ... Goldstein, S. A. N. (2009). A designer ligand specific for Kv1.3 channels from.pdf, *106*(52), 22211–22216.
- Varga, Z., Gurrola-Briones, G., Papp, F., Rodriguez de la Vega, R. C., Pedraza-Alva, G., Tajhya, R. B., ... Panyi, G. (2012). Vm24, a Natural Immunosuppressive Peptide, Potently and Selectively Blocks Kv1.3 Potassium Channels of Human T Cells. *Molecular Pharmacology*, *82*(3), 372–382.
<https://doi.org/10.1124/mol.112.078006>
- Warmke, J., Drysdale, R., & Ganetzky, B. (1991). A distinct potassium channel polypeptide encoded by the *Drosophila* eag locus. *Science*, *252*(5012), 1560–1562.
<https://doi.org/10.1126/science.1840699>
- Whicher, J., & MacKinnon, R. (2016). Structure of the voltage-gated K⁺ channel Eag1 reveals an alternative voltage sensing mechanism. *Science*, *353*(6300).
- Wu, J., Yan, Z., Li, Z., Yan, C., Lu, S., Dong, M., & Yan, N. (2015). Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 complex. *Science*, *350*(6267), aad2395-aad2395.
<https://doi.org/10.1126/science.aad2395>
- Zagotta, W. N., Olivier, N. B., Black, K. D., Young, E. C., Olson, R., & Gouaux, E. (2003). Structural

basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature*, 425(6954), 200–5. <https://doi.org/10.1038/nature01922>