



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Activación del canal oncogénico de K⁺ Kv10.1: papel sobre la proliferación, migración y viabilidad de células con propiedades tumorales.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
ESTEBAN GUTIÉRREZ GARCÍA

TUTOR PRINCIPAL
Dr. ENOCH LUIS BALTAZAR
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. ROCÍO ÁNGELES GARCÍA BECERRA
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)
Dr. JUAN CARLOS GÓMORA MARTÍNEZ
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

Ciudad de México. abril, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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.



Laboratorio Nacional de Canalopatías



Hoja de datos del jurado

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

Dr.
Luis Alfonso
Vaca
Domínguez

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

Dr.
Roberto Carlos
Muñoz
Garay

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

Dr.
Francisco Javier
Camacho
Arroyo

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

Dra.
Sara Luz
Morales
Lázaro

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

Dra.
Leticia
Rocha
Zavaleta

Agradecimiento

Este trabajo fue realizado con el apoyo del proyecto financiado por CONACYT CB-2017/2018-A1-S-13646, en donde el Dr. Enoch Luis Baltazar funge como responsable técnico.

Beca CONACYT con número de apoyo 760679.

Agradecimientos institucionales

Agradezco al personal del Laboratorio Nacional de Canalopatías (LaNCa):

Agradezco a la **Dra. María Luisa Durán Pastén** por su ayuda técnica en el manejo de los dispositivos de microscopía y fluorescencia. Agradezco al **Fis. César Óliver Lara Figueroa** por su ayuda técnica y teórica en el área de electrofisiología. Agradezco al **Dr. Arturo Hernández Cruz** como representante técnico del LaNCa. Agradezco al laboratorista **José Agustín Flores González** por su apoyo en el laboratorio.

Lista de abreviaturas

Eag1	ether-à-go-go 1 (Kv10.1)
EC ₅₀	Concentración efectiva que incrementa la corriente un 50%.
HEK	<i>Human embryonic kidney cells</i>
IC ₅₀	Concentración efectiva que inhibe la corriente en un 50%.
I-V	Curva corriente-voltaje
PBS	Solución amortiguadora de fosfato
PMR	Potencial de membrana en reposo
SFB	Suero fetal bovino
WT	Células silvestre (del inglés wild type)

1. Introducción.....	- 9 -
1.1. Generalidades.....	- 9 -
1.2. Los canales iónicos.....	- 9 -
1.2.1. Canales iónicos dependientes de voltaje.....	- 10 -
1.2.2. Superfamilia de canales K⁺ dependientes de voltaje.....	- 11 -
1.3. El canal de K⁺ Kv10.1 (EAG1).....	- 12 -
1.4. El cáncer como oncocanalopatía.....	- 15 -
1.5. Farmacología del canal Kv10.1 en la terapia anticancerígena: activadores como posible herramientas biofísicas y terapéuticas.....	- 16 -
1.6. El potencial de membrana y cáncer.....	- 18 -
1.7. Posibles moléculas con propiedades activadoras sobre el Kv10.1.....	- 18 -
2. Justificación.....	- 21 -
3. Hipótesis.....	- 22 -
4. Objetivos.....	- 22 -
4.1. Objetivo general.....	- 22 -
4.2. Objetivos particulares.....	- 22 -
5. Materiales y métodos.....	- 23 -
5.1. Cultivos celulares.....	- 23 -
5.2. Electrofisiología.....	- 24 -
5.3. Ensayo de viabilidad.....	- 26 -
5.4. Ensayo de proliferación.....	- 27 -
5.5. Ensayo de migración.....	- 28 -
5.6. Moléculas.....	- 29 -
5.7. Análisis.....	- 29 -
6. Resultados.....	- 31 -
6.1. Expresión y caracterización de las corrientes de K⁺ en células HEK-WT y HEK-Kv10.1.....	- 31 -
6.2. Estimación del potencial de membrana y capacitancia de las células HEK-Kv10.1 y HEK-WT.....	- 34 -
6.3. Las moléculas ensayadas no incrementan la amplitud de las corrientes de las células HEK-WT.....	- 35 -
6.4. El efecto del ácido dehidroabiético sobre las corrientes Kv10.1.....	- 36 -

6.5. El efecto del NS1643 sobre las corrientes Kv10.1.....	- 38 -
6.6. El efecto del PD-118057 sobre las corrientes Kv10.1.....	- 44 -
6.7. El efecto de los compuestos sobre el PMR de las células HEK-Kv10.1.....	- 45 -
6.9. Ensayo de viabilidad.	- 47 -
6.10. Ensayo de migración (Ensayo de cierre de herida).....	- 53 -
6.11. Ensayo de proliferación.	- 58 -
7. Discusión.....	- 59 -
7.1. El DHA y el NS1643 favorecen la actividad del canal Kv10.1.	- 61 -
7.2. El DHA y NS1643 afectan el potencial de membrana en reposo de las células HEK-Kv10.1.....	- 64 -
7.3. Ensayo de viabilidad: los compuestos no causan disminución de viabilidad celular.....	- 65 -
7.4. Ensayo de migración: las moléculas no afectan la migración de células CHO-Kv10.1.....	- 67 -
7.5. Ensayo de proliferación.	- 69 -
7.6 ¿El canal Kv10.1 puede ejercer sus efectos sin necesidad de conducir iones? .-	- 71 -
7.7 Perspectivas de trabajo.....	- 73 -
8. Conclusiones.....	- 74 -
Bibliografía.....	- 75 -

1. Introducción.

1.1. Generalidades.

La membrana plasmática define los bordes de las células y ayuda a mantener las diferencias de concentración entre los componentes presentes en el citosol y el ambiente extracelular. Es una bicapa lipídica en la cual los fosfolípidos son su componente principal: moléculas compuestas de un grupo alcohol, dos ácidos grasos y un grupo fosfato. Debido a la hidrofobicidad de los ácidos grasos, la membrana plasmática es una barrera relativamente impermeable al paso de moléculas solubles en agua. En todas las células, la membrana plasmática contiene proteínas, en diferentes proporciones según sea el tipo celular, y alguna de estas proteínas actúan como sensores, lo que permite a las células cambiar su comportamiento ante una plétora de estímulos y como consecuencia ayudan a mantener la homeostasis celular (Alberts B. *et al.*, 2015). Dentro de estas proteínas se encuentran las que facilitan el movimiento de nutrientes, metabolitos y iones hacia el interior o hacia el exterior celular: las proteínas transportadoras. Estos transportadores son clasificados en dos grandes grupos: los canales iónicos y los acarreadores (Rettinger J. *et al.*, 2016).

1.2. Los canales iónicos.

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana, que forman poros acuosos semipermeables cuando se encuentran en estado abierto, y su propiedad característica es que permiten el flujo o difusión de iones siguiendo su gradiente electroquímico, es decir de forma pasiva, lo que permite su movimiento al interior o exterior de las células sin gasto energético. Además, a comparación de los acarreadores su tasa de transporte es mucho más alto y por lo común es más de 10^7 – 10^8 iones/s y su conductancia unitaria varía entre 10-100 pS (Rettinger J. *et al.*, 2016). 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 2) canales iónicos activados por ligando, los cuales son activados por la unión de una molécula específica o ligando en la cara externa o interna del canal, ejemplo de estos son los canales activados por

neurotransmisores (glutamato, GABA, serotonina, etc.) (Purves D. *et al.*, 2018). Además, existen algunos otros canales iónicos conocidos como canales polimodales, los cuales pueden ser activados por ligandos químicos, cambios de voltaje y estímulos físicos como pueden ser la temperatura o la presión (Chowdhury S. & Chanda B., 2013). Los canales iónicos se expresan principalmente en la membrana plasmática de las células, sin embargo, es posible encontrarlos en la membrana de algunos organelos intracelulares. En las células excitables, la coordinación entre la apertura y el cierre de canales permiten cambios rápidos en el potencial de membrana de las células, lo que genera potenciales de acción. A pesar de la gran cantidad de canales que existe (en el humano tiene cerca de 400 genes que codifican para canales) estos comparten características comunes que los separan de los acarreadores: los canales generalmente se componen de 2 a 6 subunidades transmembranales, aunque algunos pueden ser polipéptidos grandes, y el poro transmembranal por lo general se encuentra en el centro de la estructura (Pollard T. D. *et al.*, 2017).

1.2.1. Canales iónicos dependientes de voltaje.

Los canales iónicos dependientes de voltaje (VGICs, por sus siglas en inglés) son importantes en muchas de las propiedades bioeléctricas de las células y son críticos para la comunicación eléctrica entre ellas. Los VGICs son las principales proteínas que definen la excitabilidad celular; las neuronas, las células musculares y las células secretoras los usan para generar respuestas regenerativas denominadas potenciales de acción, que inician eventos celulares mayores incluyendo exocitosis vesicular, liberación de neurotransmisores o la contracción muscular (Purves D. *et al.*, 2012; Hille B., 2001). La mayoría de VGICs producen cambios en el potencial transmembrana que pueden ir de uno a decenas de milivolts (mV) durante un potencial de acción y permiten el flujo rápido, selectivo y eficiente de los tres cationes principales: K^+ , Na^+ y Ca^{2+} ; de esta manera, hay tres familias mayores de VGICs que son expresados en células de mamíferos: Nav, Kv y Cav (la “v” denota su actividad dependiente de voltaje) (Hille B., 2001). La selectividad de los canales de cada familia de VGIC es muy alta pero no es

perfecta. La discriminación de los canales para la selectividad de iones es determinada por secuencias únicas y conservadas de aminoácidos (por ejemplo, TVGYG para los canales Kv) que se encuentran en la superficie del filtro de selectividad, en los dominios P (o hélices) del poro (entre los segmentos S5 y S6) (Doyle D. A. *et al.*, 1998). Las características de activación dentro y a través de las varias familias de VGICs pueden variar de manera importante. Además, la activación de diferentes canales puede estar modulada por muchas moléculas de señalización incluyendo Ca^{2+} , nucleótidos cíclicos, proteínas cinasas, fosfatos, proteínas G y proteínas accesorias. El canal prototipo de VGIC contiene cuatro dominios integrales de membrana, cada dominio se compone de seis segmentos α -hélices de membrana (S1-S6), para un total de 24 cruces transmembranales en todo el canal iónico. A diferencia de los Nav y Cav, que se componen de una sola proteína codificada por un gen en particular, los Kv se forman de la asociación de cuatro proteínas separadas las cuales cada una corresponden a una subunidad; las cuatro proteínas pueden ser codificadas por el mismo gen, formando un homotetrámero, o por genes diferentes, formando un heterotetrámero. Los segmentos S1-S4 de cada dominio forman el dominio sensor de voltaje, y los S5 y S6 junto con la hélice del poro forman el dominio formador del poro. Los cuatro dominios del poro se asocian en una simetría radial para formar el poro del canal en su centro (Byrne J. *et al.*, 2014).

1.2.2. Superfamilia de canales K^+ dependientes de voltaje.

Los canales de potasio son por mucho la familia más grande y diversa de canales iónicos; estos son definidos por su habilidad para facilitar el movimiento selectivo de K^+ (siguiendo su gradiente electroquímico) a través de la membrana celular. Hasta la fecha, se conocen aproximadamente 78 genes que codifican para canales de K^+ , los cuales pueden ser agrupados con base al estímulo al que 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 clasifican en 4 clases (Huang X. & Jan L. Y., 2014): canales de potasio dependientes de voltaje (Kv); canales de

potasio activados por calcio (KCa); canales de potasio rectificadores de entrada (Kir); y canales de potasio con doble dominio de poro (K2P). Los canales de potasio dependiente de voltaje se pueden dividir en 12 subfamilias (Kv1–Kv12), y entre sus funciones principales está la de ser frenos a la excitabilidad celular, manteniendo el potencial de membrana en reposo (PMR) de las células cercano al voltaje de equilibrio para el K⁺ el cual en condiciones fisiológicas es de alrededor de los - 80 mV (Purves D. *et al.*, 2018).

1.3. El canal de K⁺ Kv10.1 (EAG1).

Los primeros indicios del canal Kv10.1 se remontan a los experimentos realizados por Kaplan y Trout en 1969, en el cual las moscas de la fruta (*Drosophila melanogaster*) fueron expuestas al metanosulfonato de etilo para generar mutaciones puntuales; algunas de las moscas tratadas de esta forma desarrollaron un fenotipo de hiperexcitabilidad, caracterizado por temblores en las patas cuando eran anestesiadas con éter. Un análisis más detallado mostro que la mutación se encontró en el cromosoma X y que era una mutación dominante. Ellos postularon que dicho fenotipo posiblemente se debía a la remoción de una influencia inhibitoria presente en las moscas normales (Kaplan W. D. & Trout W. E., 1969). Años más tarde (Brüggeman A. *et al.*, 1993), se descubrió que esta influencia inhibitoria provenía de un canal de K⁺, el canal Kv10.1, el cual en las moscas normales mantiene el potencial de membrana hiperpolarizado, lejos del potencial umbral de respuesta reduciendo la probabilidad de que se generen impulsos depolarizantes espontáneos que conduzcan hacia la liberación de neurotransmisor en la unión neuromuscular de la mosca.

Estructura. En humanos el canal Kv10.1 es codificado por el gen *KCNH1* y es un canal perteneciente a la subfamilia EAG (ether-à-go-go). La proteína codificada por el gen *KCNH1* tiene 962 aminoácidos y un peso de 108 KDa (Occhiodoro T. *et al.*, 1998). El Kv10.1 comparte una organización estructural primaria común con otros canales de Kv: un canal funcional se ensambla como homotetrámero y cada subunidad tiene 6 segmentos transmembranales (S1-S6). Los dominios S1-S4 constituyen el sensor de voltaje, los dominios S5 y S6 forman el poro altamente

selectivo a potasio, con los extremos N- y C- terminal localizándose intracelularmente (Whicher J. R. & MacKinnon R., 2016; Barros *et al.*, 2020). Además, existen tres dominios intracelulares: un dominio Per-ARNT-Sim (PAS) en el extremo N-terminal que se ha asociado con la detección de oxígeno y la activación del factor inducible por hipoxia (HIF) (Morais-Cabral J. H. & Robertson G. A., 2015), un dominio C-enlazador y un dominio homólogo de unión a nucleótidos cíclicos (CNBHD) que se encuentran en el extremo C-terminal (Whicher J. R. & MacKinnon R., 2016). En la región extracelular del canal existe una región denominada “torreta” que tiene dos sitios de glicosilación y que también se ha observado en el canal Kv11.1 (hERG). Parte de la “torreta” forma una hélice, que se posiciona paralela a la membrana e interactúa con el S6. En esta posición, la cadena de azúcares rodea la abertura extracelular del poro formando un impedimento estérico que parece prevenir la unión de toxinas inhibitoras bloqueadoras de poro y que explicaría porque hay pocas toxinas con efecto sobre el canal Kv10.1 (Whicher J. R. & MacKinnon R., 2016).

Biofísica. Las corrientes iónicas generadas por el Kv10.1 se activan lentamente, y prácticamente no tienen inactivación (Whicher J. R. & MacKinnon R., 2016; Wang X. *et al.*, 2017). La conductancia unitaria del canal varía entre 4.9 pS en *Drosophila* (Brüggeman A. *et al.*, 1993) y 8.4 pS en mioblastos humanos (Stansfeld C. E. *et al.*, 1993). El potencial medio de activación ($V_{1/2}$) del canal Eag1 humano es de alrededor de 8.3 mV (Kortüm F. *et al.*, 2015). Una característica especial que presenta el Kv10.1 es que su tasa de activación es directamente proporcional al potencial de fijación antes del pulso depolarizante, es decir, entre más depolarizado es el voltaje de fijación la tasa de activación es más rápida (Bauer C. K. & Schwarz J. R., 2001); este fenómeno es parecido al llamado efecto Cole-Moore (Cole K. S. & Moore J. W., 1960).

Expresión. En humanos, el RNA transcrito del gen KCNH1 se ha detectado en cerebro y placenta a través de Northern blot (Occhiodoro T. *et al.*, 1998), pero el canal también es importante en la fusión de mioblastos (Occhiodoro T. *et al.*, 1998) y se expresa igualmente en testículos y en la glándula adrenal (Hammerlein B. *et al.*, 2006). Hammerlein y colaboradores en el 2006 realizaron un estudio en

el cual determinaron la expresión del Eag1 tanto en tejido sano como en tejido neoplásico a través de inmunohistoquímica y PCR en tiempo real de 17 tipos de tumores. Claramente el Kv10.1 se observó en cantidades muy bajas en tejidos no neuronales, aparte de los testículos, y estuvo presente en 85% de las muestras de tumores que se estudiaron. Debido a esta expresión tan diferenciada entre tejido sano y canceroso, el Kv10.1 se ha usado como biomarcador y como un factor de pronóstico que frecuentemente se correlaciona con un diagnóstico clínico que sugiere la presencia de células cancerígenas. Ejemplos de esto último ocurre en carcinoma de colon (Ousingsawat J. *et al.*, 2007), leucemia mieloide (Agarwal J.R. *et al.*, 2010), cáncer de ovario (Asher V. *et al.*, 2010), cáncer gástrico (Ding W. X. *et al.*, 2007), entre otros. Estudios realizados con ratones a los que se les eliminó el gen que codifica para Kv10.1 mostraron que la ausencia del canal no afecta el desarrollo de los ratones, ni durante su etapa embriogénica ni durante su etapa adulta (Ufartes R., 2013). Esto contrasta, con lo observado en humanos donde mutaciones con ganancia de función del canal Kv10.1 originan el Síndrome de Zimmermann-Laband (SZL) y el Síndrome de Temple-Baraitser (STB), los cuales ofrecen información sobre la importancia fisiológica que tiene el canal Kv10.1. Ambos síndromes producen deficiencia mental y las dos están asociadas con epilepsia y con hipoplasia de las uñas (Han B. *et al.*, 2017).

Regulación del Kv10.1, el ciclo celular y el cáncer. A través de diversos estudios se ha observado que la expresión del canal Kv10.1 es modulada durante el ciclo celular (Brüggemann *et al.*, 1997) y que sus propiedades biofísicas cambian a lo largo del ciclo celular (Pardo L. A. *et al.*, 1998). En condiciones normales, la expresión del canal Kv10.1 está regulado negativamente por la vía del p53 y la del retinoblastoma (Rb), que son genes supresores tumorales, el E2F1, que es un factor de transcripción y el micro-RNA miR34a el cual es un represor postranscripcional del h-EAG1 (Stühmer W., 2017). En células tumorales, la expresión de p53 y el Rb se ven alterados, con lo cual la expresión del Kv10.1 se ve incrementada. Así la expresión correcta del canal permite el progreso del ciclo celular, mientras que su inhibición lo detiene (Sánchez A. *et al.*, 2016; Urrego D. *et al.*, 2014). De esta manera se pone en evidencia el papel del Kv10.1 en la división

celular; no sólo es relevante para la división celular de células sanas sino también para la proliferación anormal de ciertas células, como las células tumorales.

1.4. El cáncer como oncocanopatía.

Desde su descubrimiento y su posterior clonación, los canales iónicos han sido establecidos como objetivos terapéuticos en patologías de células excitables (arritmias cardíacas o epilepsia), sin embargo, su vinculación en patologías de células no excitables es relativamente reciente. 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 (Lastraioli E. *et al.*, 2014). La primera evidencia experimental que mostro una relación causal entre la expresión anómala de un canal iónico y el cáncer fue presentada por Luis Pardo en 1999. En este trabajo se demostró 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 tasa alta de proliferación y de metabolismo. Además, las células que expresaban el Kv10.1 fueron trasplantadas subcutáneamente en ratones inmunosuprimidos, los cuales en cuestión de semanas desarrollaron tumores invasivos (Pardo L. A. *et al.*, 1999).

Si bien el cáncer por su naturaleza es una enfermedad genocentrista, ya que es un conjunto de enfermedades que involucra a los genes que controlan cómo la células crecen y se dividen, existe consenso y evidencia de que la expresión anómala de canales iónicos, tanto en la membrana celular como en organelos intracelulares, está involucrada 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, invasividad y metástasis (Brackenbury W. J., 2016; Prevarskaya N. *et al.*, 2018; Pardo L. A. & Stühmer W., 2014). La relación entre la expresión aberrante/funcional de algún canal iónico y su papel en alguno o varios de los procesos característicos de la carcinogénesis dio como resultado el uso de los términos de oncocanopatías y el de canales oncogénicos.

1.5. Farmacología del canal Kv10.1 en la terapia anticancerígena: activadores como posible herramientas biofísicas y terapéuticas.

Como describimos arriba, la importancia clínica del canal ha llevado a la búsqueda de compuestos específicos contra este canal que puedan emplearse como fármacos reguladores, sin embargo, la mayoría de los compuestos ensayados muestran poca especificidad. Moléculas pequeñas tales como el astemizol (García-Quiroz J. & Camacho J., 2011), imipramina (Gavrilova-Ruch O. *et al.*, 2002) o el mibefradil (Gómez-Lagunas F. *et al.*, 2017) han mostrado propiedades inhibitorias sobre la actividad del canal Kv10.1, sin embargo, también muestran tener actividad sobre otros canales iónicos. Esta acción inhibitoria de los compuestos sobre el canal se ha asociado con la disminución de características del proceso carcinogénico, por ejemplo, la imipramina demostró disminuir la proliferación en células de línea celular IGR1 el cual es un modelo de melanoma (Gavrilova-Ruch O. *et al.*, 2002) y el astemizol disminuyó el crecimiento tumoral en líneas celulares CHO y MDA-MB435S que sobreexpresaban el Kv10.1 (García-Quiroz J. & Camacho J., 2011). Otra estrategia farmacológica ha sido el uso de anticuerpos, como es el caso del mAb56, el cual es un anticuerpo dirigido contra regiones extracelulares del Kv10.1 y el cual no interfiere con la actividad de los canales Kv10.2 o Kv11.1, los cuales son estructuralmente muy parecidos al Kv10.1. El mAb56 también mostró que disminuía el crecimiento de líneas celulares de origen tumoral que sobreexpresan el Kv10.1 (Gómez-Varela D. *et al.*, 2007). Finalmente, la búsqueda de compuestos moduladores también se ha centrado en el uso de fracciones peptídicas provenientes del veneno de animales ponzoñosos, siendo 4 las descritas hasta el momento, sin embargo, la potencia de estos compuestos es baja, con concentraciones inhibitorias 50 (IC₅₀; concentraciones que inhiben el 50% de las corriente) en el rango micromolar, en comparación con la de otras toxinas que tiene como blanco de acción canales iónicos (Moreels L. *et al.*, 2017, 2016; Ma L. *et al.*, 2018).

La inhibición del Kv10.1 ha sido la vía más usada para contrarrestar las características asociadas a la sobreexpresión del canal en células tumorales. Sin embargo, el uso de activadores o potenciadores del canal puede ser también una

alternativa, tanto para conocer más acerca de la biofísica del canal, así como de intervenir en la progresión maligna de células cancerígenas.

El movimiento de iones, a través de la apertura de diversos canales iónicos que se expresan en la membrana celular, es un mecanismo fundamental que regula múltiples funciones en los diversos tejidos del organismo. La apertura de canales iónicos y el flujo de iones impacta de manera principal en el potencial de membrana de las células y el cual está asociado al inicio, modulación o finalización de múltiples procesos celulares. En células excitables los canales de K^+ son piezas claves en modular el PMR y la excitabilidad celular ya que cuando la $[K^+]$ disminuye el potencial de membrana se ve hiperpolarizado, alejándolo del valor que se necesita para que ocurra un potencial de acción; como consecuencia, diversas canalopatías asociadas a éstos canales, tienen como característica la depolarización del PMR de las células donde se expresan, afectando procesos tales como la secreción de hormonas, la liberación de neurotransmisores y/o diversas vías de señalización. En estas patologías, en las cuales existe una depolarización del potencial de membrana, el uso de moléculas con propiedades de activadores o agonistas (*openers*) de canales de K^+ se han propuesto como un modo para contrarrestar la depolarización del potencial de membrana, debido a que la apertura de estos llevaría el PMR hacia valores más negativos, cercanos al potencial de equilibrio del K^+ (Barrese V., *et al.*, 2010; Kapetanovic I. M. & Rundfeldt C. 1996). Entre las patologías que se asocian a esta característica están desordenes neurológicos como la epilepsia, ataxias, miotomía, etc. A estas patologías se puede incluir el cáncer, ya que la mayoría de las células cancerígenas tienen potenciales de membrana bastante depolarizado, respecto a las células de donde se originan (Binggeli R. & Weinstein R. C., 1986). La sobreexpresión de Kv10.1 en diversas células tumorales hace factible el uso de *openers* que reviertan el potencial de membrana depolarizado llevándolo a un estado más hiperpolarizado, y que disminuyan alguna de las propiedades malignas de los tumores.

1.6. El potencial de membrana y cáncer.

Los canales iónicos al permitir el paso de iones a través de la membrana tienen la capacidad de alterar el PMR. Estos cambios de voltaje transmembranal intervienen en varios procesos como en el control del volumen celular, en la proliferación celular y en células excitables en la generación de potenciales de acción y contractibilidad, entre otros (Abdul Kadir A. L. *et al.*, 2018). Con respecto a su rol en la proliferación celular, investigaciones realizadas por C. D. Cone en los años 70's condujeron a que éste formulara su "teoría unificada sobre el mecanismo básico de control normal mitótico y oncogénesis" (Cone, Jr. C. D., 1971). Los experimentos fueron conducidos tanto en células excitables como en células somáticas. En general, él observó que las células que están en fase de proliferación tienen un potencial de membrana menos negativo con respecto a esas mismas células en un estado mitóticamente arrestado, por ejemplo, las células CHO en proliferación tienen un voltaje cercano a -10 mV, mientras que cuando se llega a una inhibición mitótica por contacto el voltaje es cercano a -65 mV (Cone, Jr. C. D., 1974). De la misma forma cuando artificialmente se cambió la concentración de $[Na^+]_i$ se observaron resultados similares. En general estos experimentos mostraron que un aumento en la $[Na^+]_i$, que causa una depolarización del PMR, se correlaciona con inducción de respuestas mitogénicas y una disminución en la $[Na^+]_i$, que causa una hiperpolarización del PMR, se asocia con arresto mitótico. Cone también investigó el potencial de membrana en células cancerosas como células de sarcoma en las cuales demostró que tenían un potencial muy depolarizado y tenían una concentración de $[Na^+]_i$ más alta con respecto a lo que ocurría en células de tejido sano adyacente (Cone, Jr. C. D., 1974).

1.7. Posibles moléculas con propiedades activadoras sobre el Kv10.1.

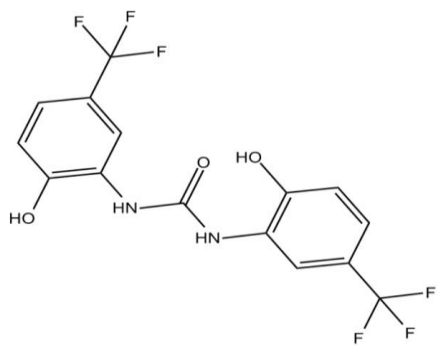
Los potenciales *openers* del Kv10.1 que se ensayaron pertenecen a una categoría de drogas farmacéuticas denominada "moléculas pequeñas" que se diferencian de otra categoría de fármacos llamada "drogas biofarmacéuticas". Las moléculas pequeñas usualmente se derivan a partir de síntesis química. Una molécula

pequeña típicamente tiene una masa menor a 1000 g/mol o 1kDa. Debido a su pequeño tamaño estos tipos de moléculas pueden ser modificadores alostéricos efectivos de diversas proteínas, ya sea extracelulares o intracelulares (Chhabra M., 2021).

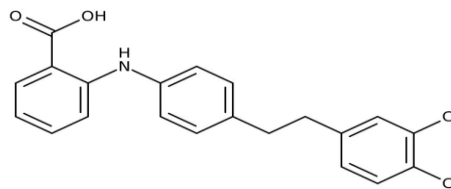
Las moléculas seleccionadas en esta tesis son: el ácido dehidroabiético (DHA), el NS1643 y el PD-118057. La estructura química de estos se puede observar en la **Fig. 1**. El DHA es un componente de la resina de varias especies de *Pinus*, es hidrofóbico y contiene un ácido carboxílico en su extremo y su peso molecular es de 300.4 g/mol. Ácidos como el DHA contenidos en la resina, tienen una estructura de 3 anillos, por lo que muy probablemente actúan sobre los canales iónicos al igual que lo hacen los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, por sus siglas en inglés) (Silverå Ejneby M. *et al.*, 2018). Se ha visto que un activador de canales BK y Shaker (Ohwada T. *et al.*, 2003; Ottosson N. E., *et al.*, 2015).

El compuesto NS1643 tiene un peso molecular de 380.24 g/mol, es una molécula que se compone de dos grupos fenoles trifluoreometilados enlazados por una molécula de urea. Este compuesto ha sido ensayado en el canal Kv11.1 (ERG1 o KCNH2), donde ejerce un efecto activador (Lansu K. & Gentile S., 2013), también es activador del canal Kv11.3 (ERG3 o KCNH7) (Perez-Neut *et al.*, 2016). Igualmente ha mostrado activar el canal Kv11.2 (ERG2 o KCNH6) (Elmedyby P., 2007).

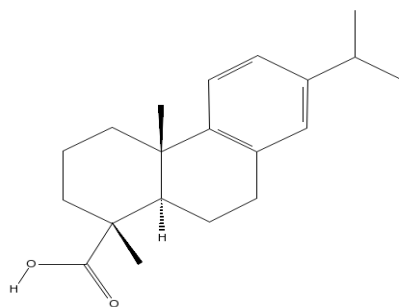
El PD-118057 es una molécula con una estructura principalmente hidrocarbonada, presenta tres anillos y en su terminal presenta un ácido carboxílico el cual se ioniza en condiciones acuosas y confiriendo a la molécula una carga negativa; el compuesto tiene un peso molecular de 386.27 g/mol. La molécula se ha reportado que es un activador del canal Kv11.1. Se ha descrito que éste y otros compuestos (BL-1249 y NS11021) que presentan un grupo cargado negativamente (carboxílico o tetrazolio) también actúan como *openers* para los canales TREK-1, BKCa y hERG.



NS1643



PD-118057



Ácido dehidroabiético (DHAA)

Figura 1. Estructura química de los compuestos a ensayar sobre el canal Kv10.1 .

2. Justificación.

En el cáncer muchas proteínas y componentes celulares se ven involucrados y cada uno de estos participan en la progresión de la enfermedad. La identificación de estos componentes y su caracterización funcional permitirán proponerlos como potenciales blancos farmacológicos que ayuden a detener la progresión de la enfermedad. De esta forma gracias a investigaciones realizadas en los últimos años, se ha encontrado que el canal iónico Kv10.1 es un buen candidato para ensayar compuestos que potencialmente tengan un efecto positivo contra el padecimiento del cáncer debido a que: 1) se sobreexpresa de forma aberrante en muchos tumores y aunado a una baja expresión en tejidos sanos disminuye la posibilidad de efectos secundarios, 2) se encuentran en la superficie de las membranas plasmáticas, por lo tanto facilitan el diseño de drogas y los convierte en un blanco accesible desde el espacio extracelular y 3) algunos los canales iónicos ya son dianas farmacológicas para el tratamiento de otras enfermedades y actualmente el 13% de los fármacos comerciales conocidos tienen como blanco un canal iónico, los cuales se usan para tratar diferentes condiciones fisiopatológicas, incluyendo enfermedades cardíacas y neurológicas (Bagal S. K. *et al.*, 2013; Clare J. J., 2010; Huang X. & Jan L. Y., 2014).

Debido a la sobreexpresión del canal Kv10.1 en muchos tipos de tumores, lo normal ha sido observar que la inhibición de la actividad del canal afecta la progresión cancerígena, y de hecho, la inhibición farmacológica del canal (usando moléculas pequeñas), tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* (ratones con tumores), han mostrado resultados positivos, aunque dichos compuestos han mostrado poca especificidad (Bernal-Ramos G. *et al.*, 2017).

En la presente tesis, se explora el efecto de inducir la apertura del canal iónico para incrementar la corriente iónica, en lugar de intentar bloquear al Kv10.1, buscando estudiar el efecto que pueden tener activadores (openers) de canales de K⁺ sobre la tasa de proliferación, migración y viabilidad de células que sobreexpresan el canal Kv10.1.

3. Hipótesis.

Las moléculas pequeñas por evaluar potenciarán las corrientes macroscópicas del canal oncogénico de K⁺ Kv10.1. Dichas moléculas disminuirán la tasas de proliferación, migración y viabilidad, propiedades estrechamente asociadas con células tumorales.

4. Objetivos.

4.1. Objetivo general.

Estudiar el efecto de las moléculas pequeñas que faciliten la apertura del canal oncogénico de K⁺ Kv10.1 y describir el efecto que estos compuestos tienen sobre la proliferación, migración y viabilidad de células con sobreexpresión del canal Kv10.1.

4.2. Objetivos particulares.

1. Estudiar mediante ensayos electrofisiológicos los compuestos: ácido dehidroabiético, NS1643 y PD-118057 sobre las corrientes iónicas generadas por el canal Kv10.1.
2. Cuantificar el cambio del potencial de membrana en reposo de las células HEK-Kv10.1 en ausencia y presencia de cada compuesto.
3. Realizar curvas dosis-efecto de los compuestos ensayados en los registros electrofisiológicos.
4. Comparación entre las EC₅₀ de los compuestos ensayados sobre la actividad del canal Kv10.1.
5. Evaluar el efecto de los compuestos ensayados sobre la tasa de proliferación, migración y viabilidad en células con sobreexpresión del canal Kv10.1.

5. Materiales y métodos.

5.1. Cultivos celulares.

Para los ensayos electrofisiológicos se usaron las líneas celulares HEK293 (*Human Embryonic Kidney*, por sus siglas en inglés) silvestres (*wild type*), las cuales de aquí en adelante las denominaremos HEK-WT y las células HEK293 las cuales expresan heterológicamente de forma estable el canal iónico de potasio Kv10.1 (HEK-Kv10.1) de humano (donadas gentilmente al LaNCa por el Dr. Walter Stühmer, del Instituto Max-Planck de Alemania). Las células HEK-WT se mantuvieron en medio de cultivo DMEM (12800-017, Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (26140087, Gibco), 1% de penicilina/estreptomicina (15140122, Gibco). El medio de cultivo de las células HEK-Kv10.1 fue el mismo que el de las HEK-WT, al cual se le adicionó el antibiótico de selección zeocina (R25001, Invitrogen) (30 µg/ml). Las células se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂. Pasadas 18 a 24 horas después de sembradas, las células se levantaron a través de medios enzimáticos y mecánicos, para esto a las células en placas o pozos de cultivo se les retiró el medio de cultivo y se les añadió tripsina durante 1 minuto, posteriormente se les agregó medio de cultivo completo y se procedió a disgregar las células adheridas con una pipeta de cultivo (disociación mecánica), las células en suspensión se centrifugaron durante 5 minutos, después el sobrenadante es retirado, se añade medio nuevo y las células se depositan en cristales circulares (18 mm de diámetro) y se incubaron durante 2 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Posteriormente, los cristales con las células se colocarán en la cámara de registro para comenzar los registros electrofisiológicos.

Para los ensayos funcionales de migración, viabilidad y proliferación, se usaron las líneas celulares CHO (*Chinese hamster ovary*, por sus siglas en inglés) silvestres (CHO-WT) y CHO las cuales expresan de forma estable el canal iónico de K⁺ Kv10.1 (CHO-Kv10.1) de humano (donadas gentilmente al LaNCa por el Dr. Luis Pardo a través del Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo). Las células CHO-WT se mantuvieron en medio de cultivo combinado (a una proporción de 1:1) de DMEM y F-12 (12800-017, Gibco) suplementado con 10% de SFB (26140087, Gibco), 1%

de penicilina/estreptomicina (15140122, Gibco). El medio de cultivo de las células CHO-Kv10.1 fue el mismo que el de las CHO-WT, al cual se le adicionó el antibiótico de selección zeocina (R25001, Invitrogen) (30 µg/ml). Las células se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂.

5.2. Electrofisiología.

Las corrientes iónicas generadas por las células HEK-Kv10.1 fueron estudiadas mediante la técnica de *patch-clamp* en el modo de fijación de voltaje (*voltage-clamp*) en la configuración de célula completa (*whole-cell*). Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (20-25 °C) y las células fueron perfundidas constantemente con solución extracelular estándar (**Tabla 1**) mediante un sistema de perfusión por gravedad (2.5 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. 2A**). Para obtener el curso temporal del efecto de los fármacos, así como el análisis estadístico se utilizó un pulso fijo a 0 mV con 250 ms de duración (**Fig. 2A**), aplicado cada 3 o 5 segundos, dependiendo del efecto del compuesto. Adicionalmente, se realizaron rampas de voltaje de -100 a +50 mV con un segundo de duración y aplicados cada 3 segundos (**Fig. 2B**).

Para los experimentos en donde se cuantificó el PMR de las células y el efecto de los compuestos sobre éste, se utilizó la configuración de fijación de corriente (*current-clamp*). En esta configuración, el PMR de cada células se dejó libre (no se inyectó corriente), y se muestreo a 10 KHz. El protocolo de registro consistió en 1 minuto de registro control, 1 minuto de registro en presencia de los compuestos de interés y después de esto el lavado (**Fig. 2C**).

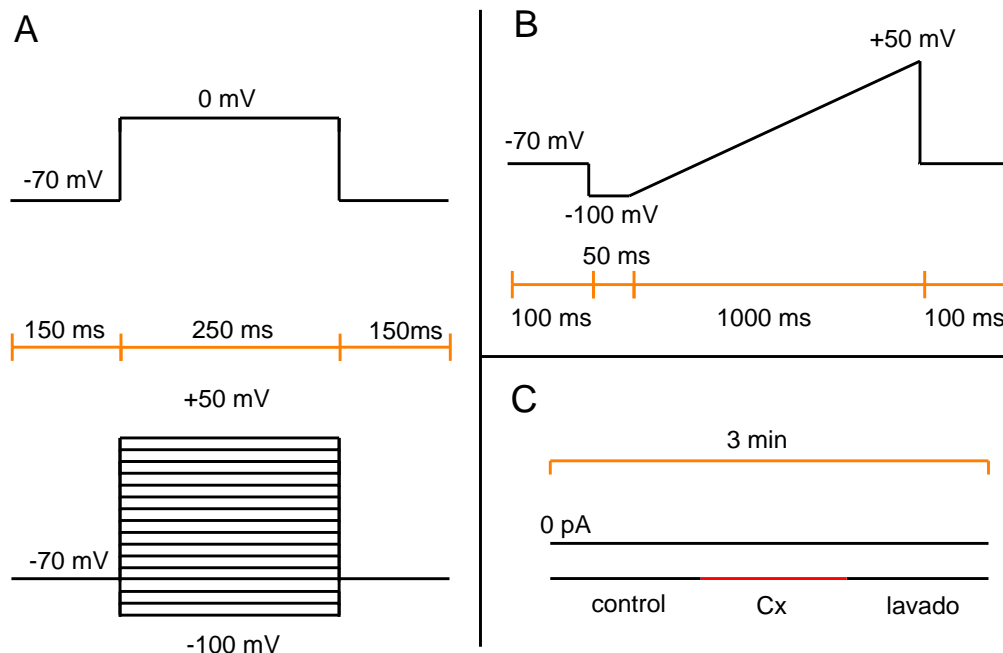


Figura 2. Protocolos electrofisiológicos. **A)** Protocolos en modo de fijación de voltaje. Arriba, protocolo de pasos de voltaje para construir las curvas I-V, inicia en -100 mV y termina en +50 mV en saltos de 10 mV. El segundo protocolo es un pulso fijo a 0 mV. Los dos protocolos parten y terminan en un voltaje de mantenimiento de -70 mV. **B)** Rampa de voltaje de -100 mV a +50 mV, con una duración de 1 s utilizada para construir curvas I-V. **C)** Protocolo en modo de fijación de corriente para evaluar los cambios sobre el PMR. El protocolo no inyecta corriente, es decir, se permite que la célula se mantenga en su PMR libre. El protocolo consiste de 3 fases (control, compuesto (Cx), lavado), cada una con una duración de 1 minuto.

Las corrientes se registraron con un amplificador Multiclamp 700B (Molecular Devices), a una velocidad de muestreo de 10 kHz. Los datos se digitalizaron usando el conversor analógico-digital Axon Digitada 1550 (Molecular Devices). El control de los estímulos y la adquisición de los datos se realizó con el programa pClamp 10 (Molecular Devices). En estos experimentos se usaron pipetas con una resistencia de 4-6 M Ω fabricadas con capilares de vidrio de borosilicato (Kwik-Fil, WPI, USA). Cada pipeta se llenó con solución intracelular (**Tabla 1**).

Reactivos	Solución intracelular [mM]	Solución extracelular [mM]
KCl	140	5.4
NaCl	-	140
MgCl ₂	1	1.2
EGTA	10	-
HEPES	10	10
Glucosa	-	10
CaCl ₂	-	1.8
pH	7.2	7.4
Osmolaridad	300 mOsm	300 mOsm
pH	7.2 ajustado con KOH	7.4 ajustado con NaOH

Tabla 1. Soluciones para los registros electrofisiológicos.

Los compuestos fueron aplicados directamente a la célula de interés mediante un sistema de perfusión por gravedad VC-6 acoplado a un controlador de vías (SF-77B, Warner Instruments). Para la construcción de las curvas dosis-respuesta, los valores normalizados de corriente se graficaron y se ajustó a una Ec. de Hill.

$$Potenciación = B_{max} \frac{c^n}{EC_{50}^n + c^n}$$

en donde, B_{max} es la potenciación máxima, EC_{50} la concentración a la cual se potencia el 50% de la corriente, c es la concentración de la molécula ensayada y n es el coeficiente de Hill.

5.3. Ensayo de viabilidad.

Todos los ensayos funcionales se realizaron con células CHO-WT y CHO-Kv10.1. Las células CHO-Kv10.1 fueron expuestas a ensayos de *patch-clamp* para verificar que las células generaran las corrientes típicas del canal Kv10.1 y verificar la presencia del canal Kv10.1.

La viabilidad celular se cuantificó a través de la medición simultánea de la fluorescencia emitida por las moléculas calceína-AM de color rojo-anaranjado

(577/590 nm) (C34851, Invitrogen™) y DAPI (377/447 nm) (D21490, Invitrogen™). Las células CHO-WT y CHO-Kv10.1 se sembraron a una concentración de 20,000 células por pozo en placas de cultivo de 24 pozos (#3524, Costar) y se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ durante 24 horas. Transcurrida las 24 h, el medio de cada pozo fue sustituido por nuevo medio completo adicionado con cada una de las moléculas a ensayar y se incubaron durante 24 h. Transcurrido dicho tiempo, el medio de cada pozo fue sustituido por medio solo que contenía calceína-AM (1 µM) y DAPI (300 nM); las células en estas condiciones fueron incubadas durante 15 min. Terminado el tiempo de incubación el medio es cambiado por PBS (solución amortiguadora de fosfato con pH 7.4, por sus siglas en inglés) debido a que el medio de crecimiento presenta fluorescencia; después las placas de cultivo con las células fueron colocadas en el equipo ImageXpress Micro XLS (Molecular Devices), el cual es un microscopio invertido automatizado. Las células vivas fueron aquellas que mostraban señal fluorescente para calceína y las células muertas aquellas que mostraban señal para DAPI. Las imágenes fueron tomadas usando un objetivo de 20x. Para la cuantificación de células vivas y muertas se tomaron 9 imágenes por pozo. Como control positivo de células muertas se usó Tritón al 0.1% y para comparación con el NS1643 y el DHA, que son potenciadores del canal Kv10.1, se ensayó el astemizol a 10 µM el cual es un inhibidor del canal. El conteo total de células, para cada condición, representa 3 experimentos independientes realizados por duplicado. Las fotografías capturadas fueron analizadas por el procesador de imágenes FIJI (Schindelin *et al.*, 2012).

5.4. Ensayo de proliferación.

Para evaluar el efecto de la molécula de interés sobre la proliferación celular se utilizó el ensayo de MTT. El cual es un ensayo colorimétrico basado en la reducción de la molécula de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; que es una sal de tetrazolio que mide la actividad de varias enzimas deshidrogenasas) a formazán. Esta reacción ocurre en las mitocondrias y por esta razón sólo en células vivas. La metabolización del MTT, que es de color amarillo produce cristales de formazán de color azul oscuro. La cantidad de

formazán generado es directamente proporcional a la cantidad de células presentes (Mosmann T., 1983).

El efecto de las moléculas pequeñas sobre la proliferación se determinó añadiéndolos a células CHO-WT y CHO-Kv10.1 en cultivo durante 72 h. Las células fueron sembradas en placas de cultivos de 96 pozos a una densidad de 500 células por pozo en un volumen de 100 μ l. Las placas con células fueron mantenidas en una incubadora (37 °C y 5% CO₂) durante 24 h para favorecer su adhesión a la placa y que se recuperaran del tratamiento enzimático. Pasado este tiempo el medio de cultivo de las placas se sustituyó con el medio de cultivo adicionado con los compuestos de interés, y se realizó la primera medición con MTT, este momento fue considerado el tiempo 0 del experimento. Para la lectura de MTT en cada pozo, el medio de cultivo es retirado y sustituido con 100 μ l de medio más 10 μ l de MTT (12 μ M) el cual se deja incubando por 4 h; al concluir este tiempo se retiran 75 μ l del medio con MTT y se adiciona 50 μ l DMSO (el cual disuelve los cristales de formazán) durante 10 min. La absorbancia fue medida en el lector multimodal de placas FlexStation 3 (Molecular Devices) a una longitud de onda de 570 nm. Cada 24 horas se realizaba el recambio de medio adicionado con cada molécula de interés. Los datos obtenidos representan 3 experimentos independientes realizados por triplicado.

5.5. Ensayo de migración.

Para evaluar el efecto de los compuestos de interés sobre la migración de células CHO-WT y CHO-Kv10.1 se realizó el ensayo del cierre de herida. Para reducir las variaciones en el tamaño de las heridas entre pozo y pozo, los experimentos se realizaron con unos insertos plásticos (#CBA-120, Cell Biolabs, INC) los cuales se colocaron en placas de 24 pozos; estos insertos generan un espacio en el fondo de los pozos (donde no se adhieren células) con un ancho aproximado de 0.9 mm. Después de colocar los insertos, las células en suspensión (0.5 ml) se agregaron a los pozos a través de espacios laterales en los insertos a una concentración de 1×10^6 células por pozo. La placa con células e insertos se colocan en la incubadora toda la noche para favorecer la formación de

una monocapa de células. Transcurridas 24 horas de cultivo y para que los cambios observados se consideren debidos a la migración y no a la proliferación celular, el medio de cultivo de los pozos se retira y es sustituido por medio con 0.5% de SFB y con 12 μM de mitomicina C durante 3 horas. Después de tres horas el medio se vuelve a sustituir con medio completo adicionado con las moléculas de interés. Todos los compuestos a evaluar se prepararon a una concentración de 10 μM y 100 μM . En este momento se adquieren las imágenes para todos los pozos y se considera el tiempo 0 h. Después de 24 horas, se retira el medio de cada pozo (esto es para retirar células no adheridas al sustrato) y se sustituye por medio fresco con las mismas condiciones anteriores, hecho esto se capturan las imágenes correspondientes a las 24 horas. Todas las imágenes fueron adquiridas en el equipo ImageXpress Micro XLS (Molecular Devices) usando un objetivo de 4x. El análisis de imágenes se realiza usando el procesador de imágenes FIJI (Schindelin *et al.*, 2012).

5.6. Moléculas.

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

NS1643 (SC-204135, Sigma-Aldrich); Ácido dehidroabiético (SC-499572B, Santa Cruz Biotechnology); PD-118057 (P5624-5M, Sigma-Aldrich); Dimetilsulfóxido (D0231, Biobasic); TritónTM X-100 (X100-100ML, Sigma-Aldrich); Astemizol (A2861, Sigma Aldrich).

5.7. Análisis.

Para los ensayos electrofisiológicos, en donde se comparaban amplitudes de corriente normalizada de situación control versus amplitudes de corriente normalizada de un tratamiento se utilizó una prueba t de Student pareada. Para el análisis de los ensayos funcionales se realizó un ANOVA de una vía y la prueba de Tukey como prueba post-hoc para conocer si los tratamientos tienen una

significancia estadística con respecto al control. Se consideró que el resultado es estadísticamente significativo si el valor P es menor a 0.05. Los resultados fueron graficados y analizados usando los paquetes del software Origin 2016 (OriginLab).

6. Resultados.

6.1. Expresión y caracterización de las corrientes de K⁺ en células HEK-WT y HEK-Kv10.1.

La primera parte de los experimentos se encaminaron a caracterizar, mediante ensayos electrofisiológicos, el efecto de las moléculas DHA, NS1643 y PD-118057 sobre las corrientes generadas por el canal Kv10.1. En nuestras condiciones experimentales, las células HEK con expresión estable del canal humano Kv10.1 (HEK-Kv10.1) generaron corrientes macroscópicas dependientes de voltaje muy similares a la reportadas en la literatura, las cuales incrementaron su amplitud de forma dependiente con la depolarización del potencial de membrana, la corriente se activó de una manera relativamente lenta y no se observó inactivación durante el estímulo de voltaje (**Fig. 3A**). Para corroborar que el canal Kv10.1 era expresado únicamente en esta línea celular, se registraron las corrientes macroscópicas, usando el mismo protocolo experimental, en la línea celular HEK293 silvestre (HEK-WT) (**Fig. 3B**). De manera similar a lo reportado en la literatura, cuando se graficó la amplitud de la corriente de las células HEK-Kv10.1 (medida en la parte estable) en función del voltaje se obtuvieron gráficas corriente-voltaje (I-V) en las cuales se puede observar que las corrientes tenían un comportamiento rectificante de salida (**Fig. 3C**). Estos resultados demuestran la expresión funcional del canal Kv10.1 en esta línea celular. Las corrientes iónicas generadas por pulsos de voltaje depolarizantes en las células HEK-WT fueron de menor amplitud en un orden de magnitud que las registradas en las células HEK-Kv10.1 y parecieron ser debidas a la activación de un canal de K⁺ expresado de forma nativa en estas células. Al realizar las gráficas I-V de los trazos obtenidos en HEK-WT se observa un comportamiento lineal, atribuido probablemente a conductancias denominadas de fuga (**Fig. 3C**). En la **Fig. 3D** se observa una gráfica de barras con la cuantificación y comparación de las corrientes iónicas de las dos líneas celulares generadas a +50 mV, con valores de 0.15 ± 0.01 nA en las HEK-WT vs 3.75 ± 0.62 nA en las HEK-KV10.1 ($P < 0.01$, prueba t de Student no pareada). Posteriormente, se evaluó si la aplicación de pulsos fijos de voltaje a 0 mV producía corrientes Kv10.1 estables. Como se puede observar en la **Fig. 3E-F**,

las corrientes Kv10.1 no mostraron una desensibilización ante estímulos repetitivos y no se vieron afectadas significativamente por la aplicación de DMSO (vehículo en el cual se diluyen los fármacos lo que dio seguridad para realizar los ensayos farmacológicos). El DMSO se evaluó a una concentración de 0.1% el cual fue la concentración de DMSO más alta que se usó. El DMSO fue aplicado durante 3 minutos, tiempo mayor al cual (como se mostrará más adelante) los compuestos fueron perfundidos. El DMSO no produjo un efecto significativo sobre las corrientes generadas con un pulso a 0 mV, con valores control promedio de 0.93 ± 0.33 nA y de 0.91 ± 0.32 nA en presencia del DMSO ($P > 0.05$; $n = 4$, prueba t-Student pareada).

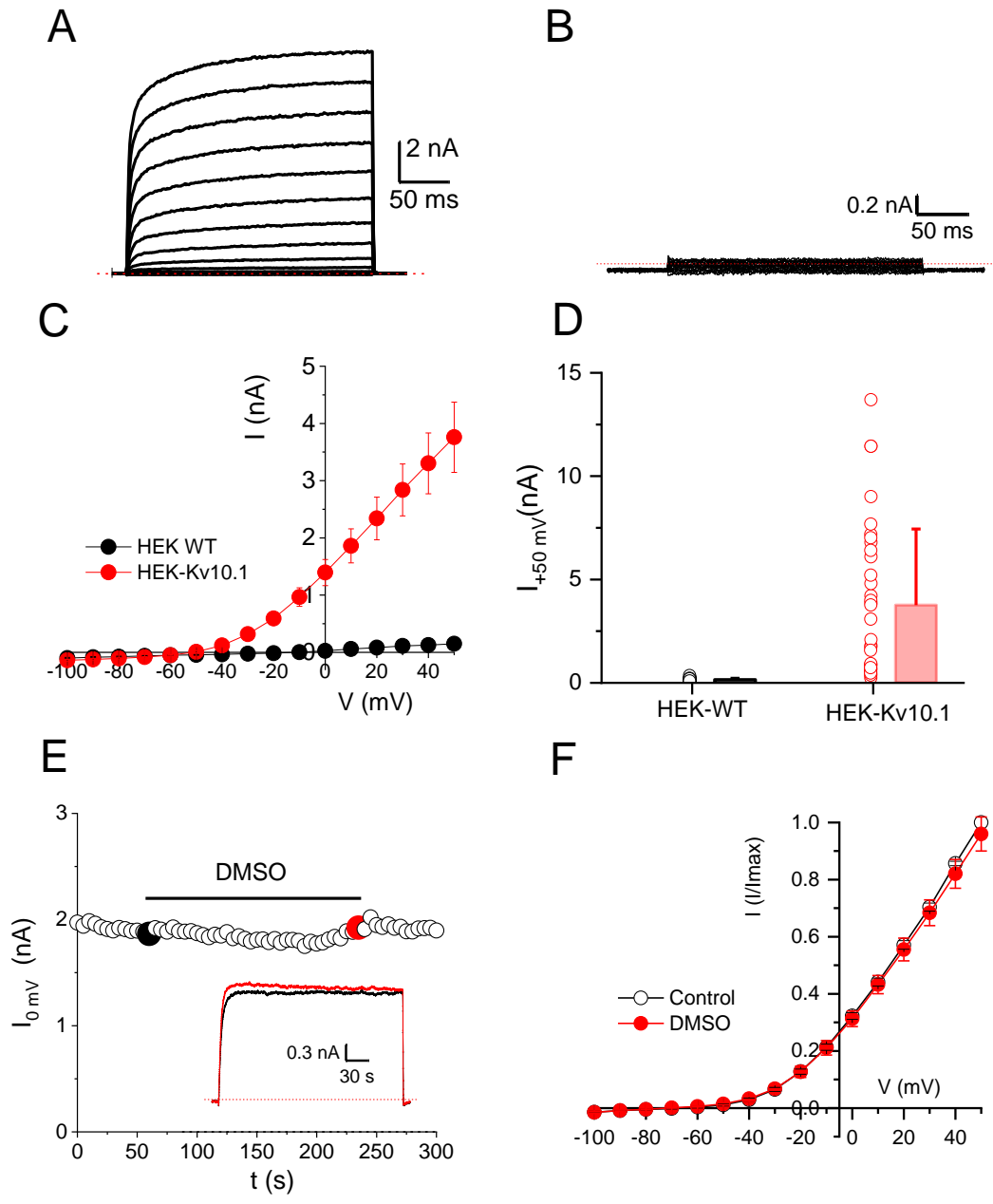


Figura 3. Corrientes macroscópicas en células HEK-Kv10.1 y HEK-WT. **A)** Corriente macroscópica típica de una célula HEK293 con expresión estable del canal Kv10.1. **B)** Corriente macroscópica de una célula HEK293 silvestre (WT). **C)** Curva corriente-voltaje (IV) promedio en células HEK-Kv10.1 (n = 34) y HEK WT (n = 24). **D)** Gráfica de barras con el promedio de la amplitud de las corrientes medidas a +50 mV en las células HEK-WT y HEK-Kv10.1; los círculos vacíos a cada lado las cajas representan los valores de cada una de las células registradas. **E)** Curso temporal de las corrientes Kv10.1 generadas a 0 mV en presencia de DMSO durante tres minutos. En el inserto se pueden observar corrientes en situación control (trazo y círculo negro) y en presencia de DMSO (trazo y círculo rojo). **F)** Gráfica IV en situación control y en presencia de DMSO (n = 4). La línea punteada en rojo en la figura A, B y en el inserto de la E representa 0 pA de corriente.

6.2. Estimación del potencial de membrana y capacitancia de las células HEK-Kv10.1 y HEK-WT.

A la par de estos controles, se midió el PMR de ambas líneas celulares; las células HEK-Kv10.1 mostraron un PMR más hiperpolarizado que las células HEK-WT (-44.4 ± 1.5 mV y -5.7 ± 1.0 mV, respectivamente) (**Tabla 2** y **Fig. 4**); el PMR de las células HEK-Kv10.1 se acercó al potencial de equilibrio teórico para el ion K^+ (basado en nuestras soluciones de registro) que es de -83.63 mV (a temperatura ambiente). El valor de capacitancia celular, el cual tiene relación con el área de membrana celular también fue estadísticamente mayor en las células HEK-Kv10.1 con respecto a las WT (**Tabla 2**).

	PMR (mV)	Capacitancia (pF)	n
HEK-WT	-5.7 ± 1.0	13.6 ± 1.1	31
HEK-Kv10.1	-44.4 ± 1.5	18.7 ± 1.1	78
Valor de P	< 0.001	< 0.01	

Tabla 2. Promedio del PMR y capacitancia en células HEK-WT y HEK-Kv10.1. Los valores de P fueron obtenidos de un t-test para muestras no pareadas.

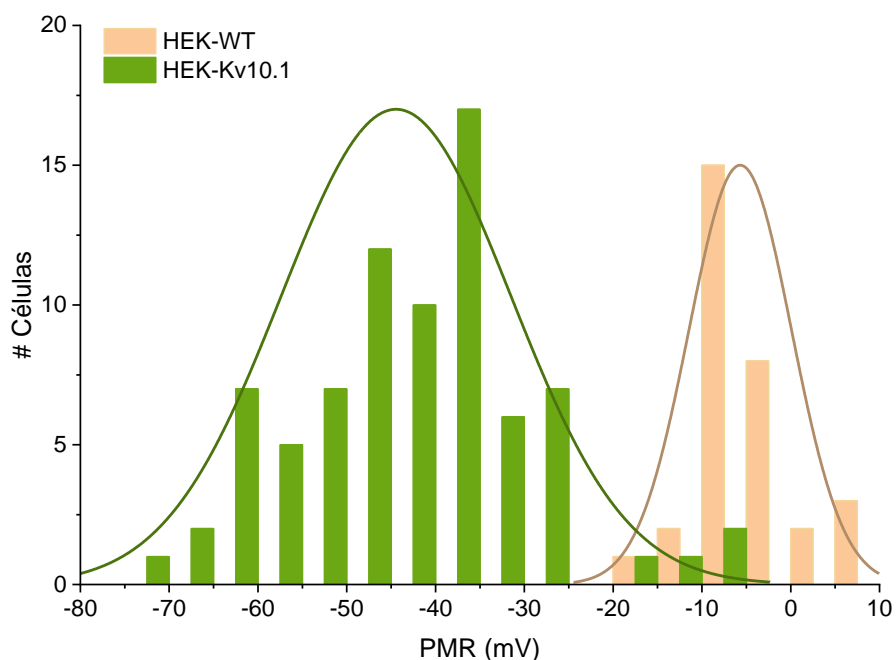


Figura 4. PMR en células HEK-WT y HEK-Kv10.1. Gráfica de distribución de frecuencias del PMR de todas las células contabilizadas.

6.3. Las moléculas ensayadas no incrementan la amplitud de las corrientes de las células HEK-WT.

Para evitar sobreestimar algún efecto que las tres moléculas pudieran tener sobre las corrientes de “fuga” (que están presentes de forma nativa en las células HEK-WT) se decidió ensayar los compuestos (a concentraciones de 100 μ M en todos los casos) sobre las corrientes generadas con pulsos fijos de voltaje a 0 mV. Tanto el DHA (n = 5) (**Fig. 5A y 5D**) como el PD-118057 (n = 5) (**Fig. 5B y 5E**) no modificaron la amplitud de las corrientes de forma significativa ($P > 0.05$, t-test pareado). Por otro lado, el NS1643 (**Fig. 5C, 4F**) causó una inhibición estadísticamente significativa ($P < 0.01$, prueba t-Student pareada) sobre las corrientes, pasando de 21.4 ± 6.6 pA en control a -8.9 ± 1.8 pA con el NS1643 (n = 5). Estos resultados nos dan certeza de que los efectos observados sobre las corrientes generadas por el canal Kv10.1 no serán sobreestimados.

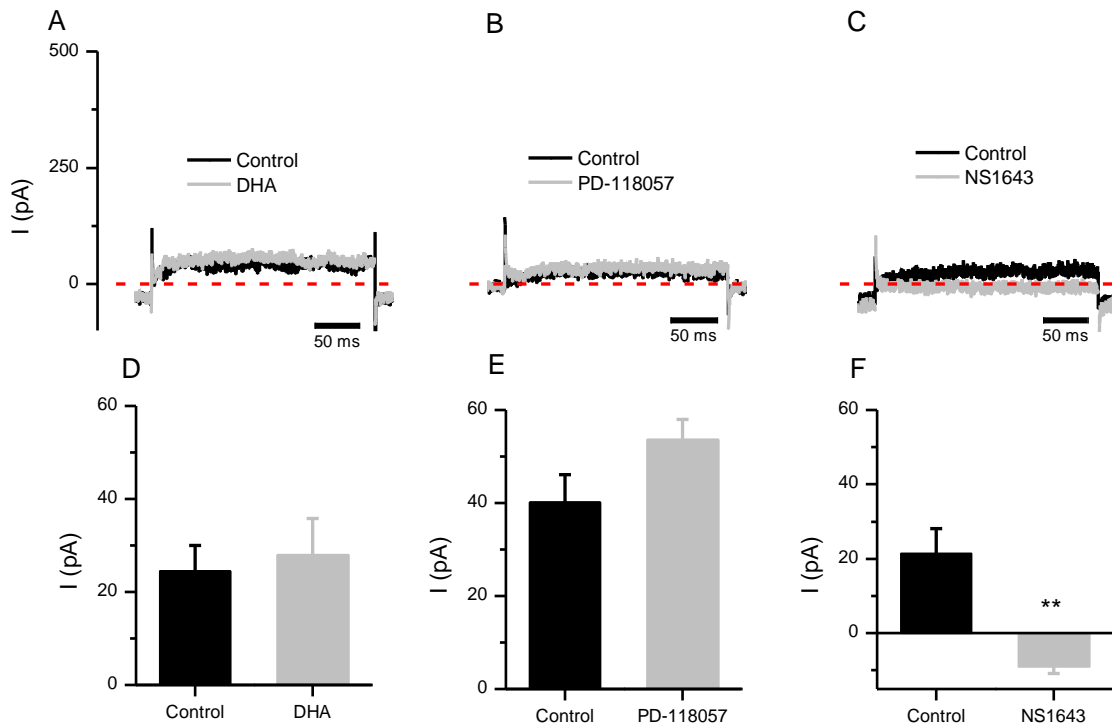


Figura 5. Efecto de las moléculas DHA, PD-118057 y NS1643 sobre las corrientes iónicas de las células HEK-WT. A, B y C) Trazos representativos de las corrientes macroscópicas en células HEK-WT generadas con un pulso a 0 mV en control (trazo negro) y en presencia de los diferentes compuestos (trazo gris) ensayados todos a 100 μ M. **D, E y F)** Grafica de barras con las amplitudes de corriente en control (barra negra) y con los diferentes compuestos ensayados (barra gris). La línea punteada en rojo en la figura A, B y C representa 0 pA de corriente. n = 5 para los tres compuestos. ** para un valor de $P < 0.05$.

6.4. El efecto del ácido dehidroabiético sobre las corrientes Kv10.1

La primera molécula de interés a estudiar fue el ácido dehidroabiético (DHA) sobre las corrientes Kv10.1. El DHA es una resina natural obtenida de los pinos, y la cual recientemente se ha descrito como un activador (*opener*) electrostático de canales de K^+ dependientes de voltaje.

La aplicación de DHA (100 μ M) produjo un incremento en la amplitud de las corrientes Kv10.1, dicho efecto fue reversible durante el lavado (**Fig. 6**). Para realizar el análisis estadístico se cuantificó la amplitud de las corrientes generadas a 0 mV. En presencia de 100 μ M de DHA se obtuvo que las corrientes Kv10.1 eran en promedio 2.7 más grandes en amplitud, de 1.83 ± 0.65 nA en control a

4.57 ± 1.46 con DHA ($n = 6$; $P < 0.05$, prueba t-Student pareada) (**Fig. 7A**). Al evaluar el DHA en un rango de concentración de 0.1 a 100 μM ($n = 8$ para 0.1, 10, 30 μM y $n = 6$ para 100 μM) se observó que el efecto potenciador de la molécula fue dependiente de la concentración (prueba de tendencia: $P < 0.001$) (**Fig. 7**); con los datos normalizados de la potenciación se construyeron las curvas dosis-respuesta a los cuales se les ajustó una ecuación de Hill, arrojando un valor de $\text{EC}_{50} 36.1 \pm 4.5 \mu\text{M}$ (**Fig. 7B**).

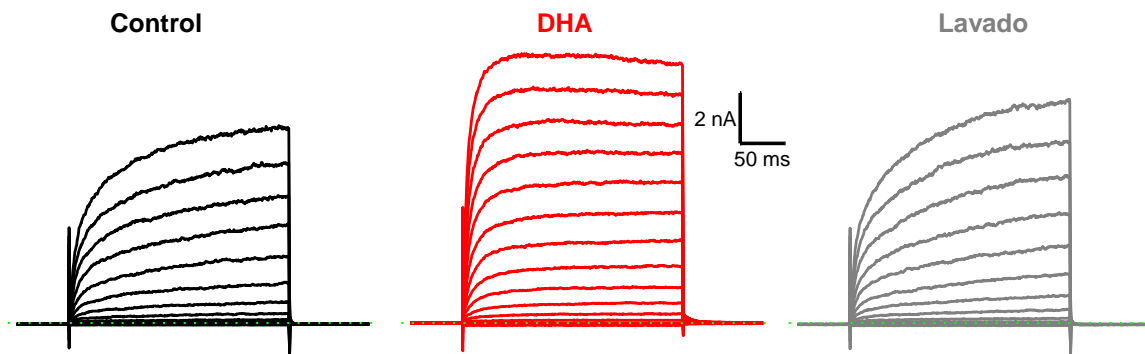


Figura 6. Efecto de DHA sobre las corrientes Kv10.1. Familia de corrientes Kv10.1 durante el control (negro), en presencia de 100 μM de DHA (rojo) y lavado (gris).

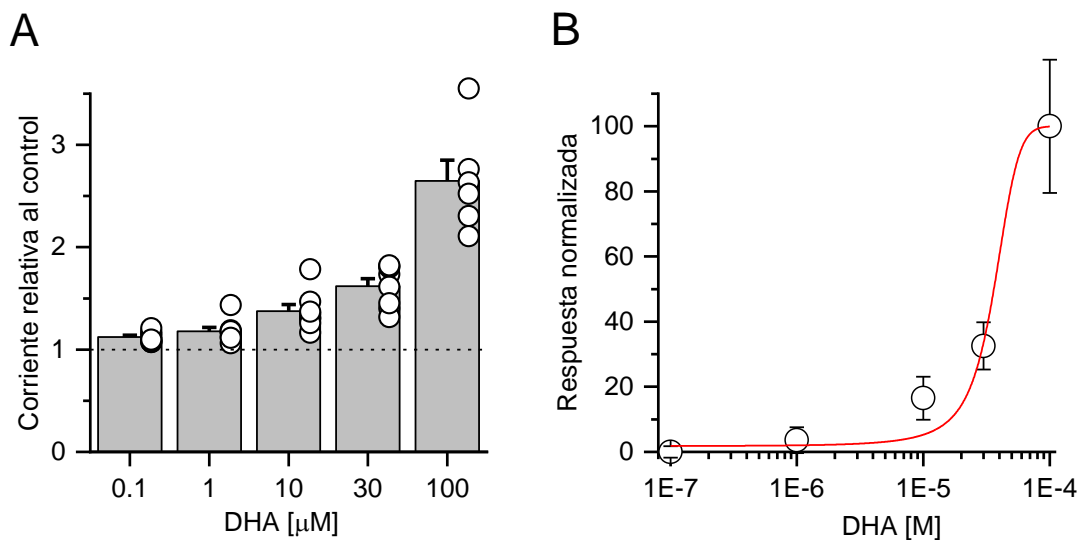


Figura 7. Efecto potenciador del DHA sobre las corrientes Kv10.1. A) Las gráficas de barras representan el promedio y el error estándar del efecto del DHA. Las corrientes Kv10.1 fueron generadas con pulsos fijos a 0 mV. Se ensayaron las concentraciones 0.1 ($n = 8$) 1 ($n = 8$), 10 ($n = 8$), 30 ($n = 8$) y 100 ($n = 6$) μM y se realizó una prueba de tendencia para evaluar si el efecto potenciador era dependiente de la concentración

($P < 0.001$). **B**) Curva dosis-respuesta del DHA sobre las corrientes Kv10.1. La línea roja representa el ajuste realizado con la ecuación de Hill.

Con los datos obtenidos de la familia de corrientes, se realizó el análisis de conductancia. En presencia de $100 \mu\text{M}$ de DHA, se observó que el $V_{1/2}$ de activación se desplazó hacia valores más negativos ($\Delta 40 \text{ mV}$), de 18.7 mV en situación control a -22.7 en presencia de DHA (**Fig. 8**; $n = 4$).

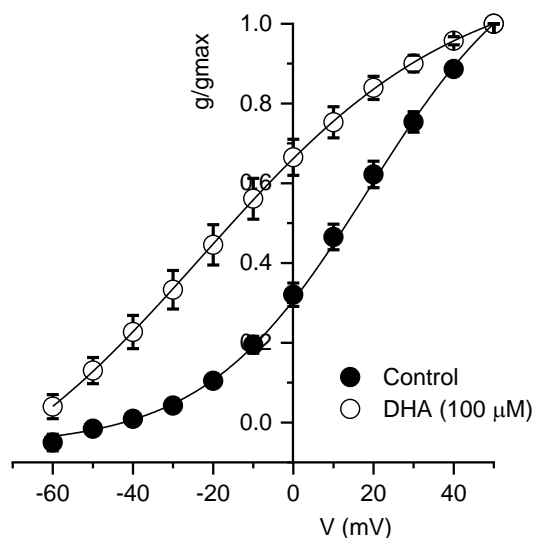


Figura 8. Curvas de conductancia. La aplicación de DHA ($100 \mu\text{M}$) desplaza el $V_{1/2}$ de activación hacia valores de potencial de membrana más negativos. Los datos en control y con DHA fueron ajustados con la ecuación de Boltzmann (línea negra). Los datos representan el promedio y el error de 6 células.

6.5. El efecto del NS1643 sobre las corrientes Kv10.1.

El segundo compuesto a ensayar fue el NS1643, el cual es una molécula sintética que ha sido descrita como un modulador positivo del canal Kv11.1 y del canal Kv7.2 (KCNQ2).

Para realizar el análisis estadístico, así como observar el curso temporal del efecto del NS1643 sobre las amplitudes de las corrientes, se usaron pulsos fijos de voltaje a 0 mV . Se ensayaron 5 concentraciones de NS1643 ($1, 3, 10, 30$ y $100 \mu\text{M}$; $n = 5$ en todos los casos) de las cuales las tres concentraciones más altas ejercieron un efecto bifásico sobre la amplitud de las corrientes Kv10.1. Como se

puede observar en el curso temporal de la **Fig. 9A**, la aplicación de NS1643 (100 μM) ejerció un efecto potenciador casi instantáneo sobre las corrientes Kv10.1 generadas a 0 mV, dicho efecto fue seguido de un efecto inhibitor más potente; en algunos registros era posible observar una ligera recuperación de la corriente durante el lavado. En la **Fig. 9B** se puede observar un ejemplo representativo de las corrientes Kv10.1 bajo el efecto del NS1643 a 100 μM . Debido a que el efecto potenciador fue transitorio, decidimos cuantificar la corriente en dos regiones: en donde observábamos la corriente máxima instantánea (I_{inst}) y en la región estable de la corriente (I_{ss} , casi al final del estímulo); con dichos valores de corriente se construyó el curso temporal de la **Fig. 9A**.

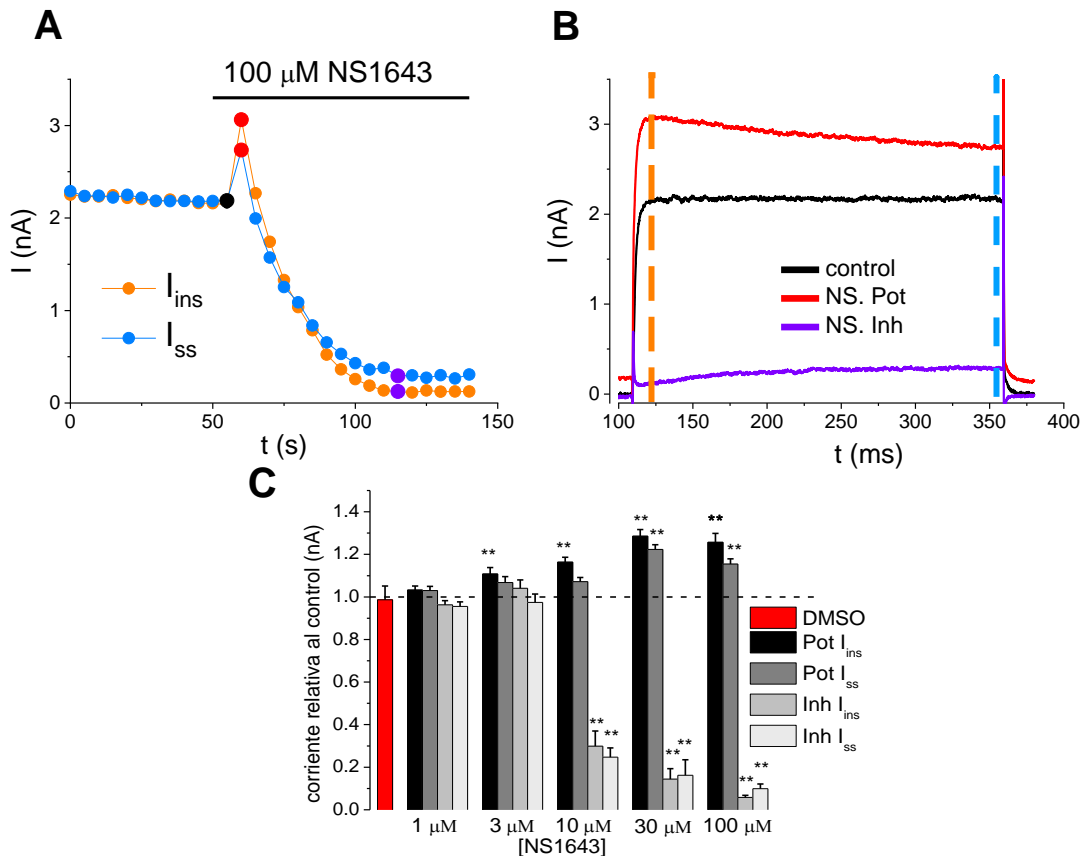


Figura 9. Efecto bifásico del NS1683 sobre las corrientes Kv10.1. **A)** Curso temporal del efecto de NS1643 sobre las corrientes Kv10.1. En círculos naranjas se representa la amplitud de la corriente cuantificada en la región I_{ins} de la figura B, y los círculos azules en la región de I_{ss} . Los círculos rellenos de color negro, rojo y morado representan los trazos de corriente de la figura en B. **B)** Corrientes Kv10.1 generadas por un pulso de voltaje a 0 mV. Los trazos representan la condición control (negro), el máximo efecto potenciador de NS1643 (rojo) y la máxima inhibición causada por el NS1643 (morado). Las líneas punteadas en la figura

representan las regiones I_{ins} (puntilleo naranja) e I_{ss} (puntilleo azul) en donde se cuantifico la amplitud de la corriente Kv10.1. **C)** Gráfica dosis-respuesta del efecto potenciador e inhibidor del NS1643 sobre la I_{inst} y I_{ss} ; la cuantificación del efecto de DMSO se muestra en color rojo. Los datos se encuentran normalizados respecto al valor de corriente control. $n = 5$ para ambos, potenciación e inhibición a todas las concentraciones. $** = P < 0.05$,

En la **Fig. 9C** se muestra las dosis respuestas a las cuatro concentraciones, tanto en la fase I_{ins} como en la I_{ss} ; todas las corrientes están normalizadas con respecto a la corriente control antes de aplicar NS1643.

A partir de los datos obtenidos se construyeron las curvas dosis-respuesta, tanto de la potenciación observada como de la inhibición. A los datos se les ajustó una ecuación de Hill, obteniendo para la fase instantánea una IC_{50} de $9.13 \mu M \pm 0.001$ y una EC_{50} de $6.62 \pm 3.92 \mu M$ (**Fig. 10**). En la fase estable la IC_{50} obtenida es de $6.85 \pm 1.95 \mu M$ y la EC_{50} es de $8.70 \pm 1.31 \mu M$.

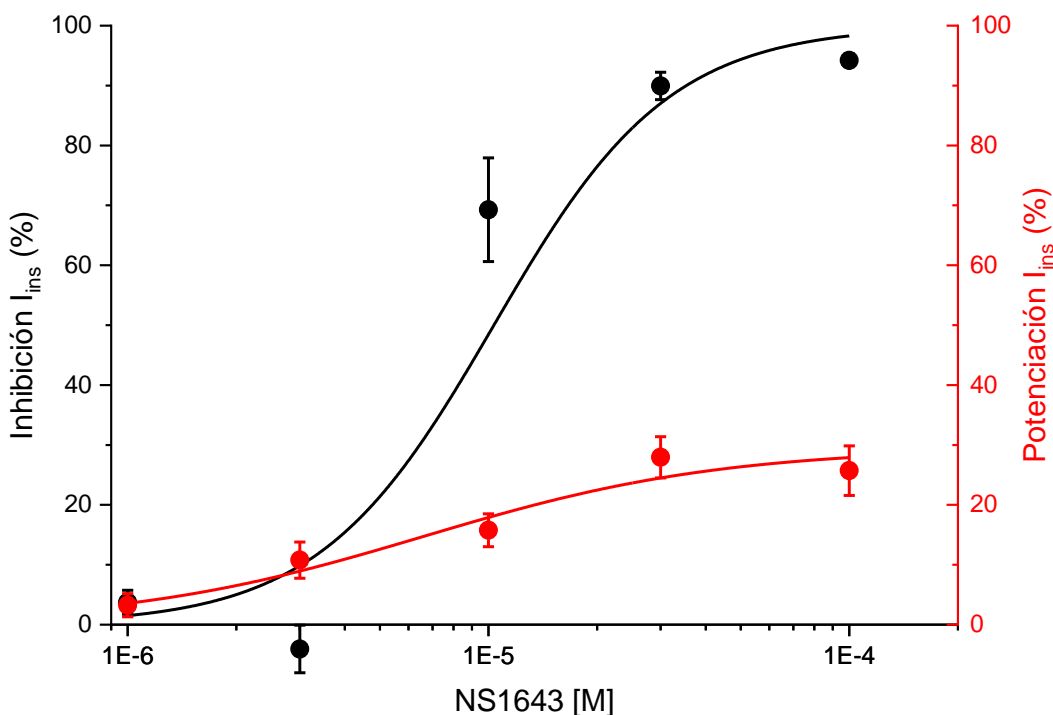


Figura 10. Efecto dosis-respuesta del NS1643 sobre las corrientes de las HEK-Kv10.1 obtenida de la fase instantánea. Inhibición (negro) y potenciación (rojo) con respecto a las corrientes control dependiente de la concentración. La línea sólida en negro y rojo representan el ajuste con la Ec. De Hill, para la inhibición y potenciación, respectivamente.

En el momento en el que el NS1643 ejercía su mayor efecto potenciador, parece haber una disminución en la τ (τ) de activación de las corrientes. Por tal motivo, se ajustó una exponencial simple a los primeros 10 milisegundos en que la corriente se incrementaba (**Fig. 11A**). El ajuste mostro que el NS1643 no modificaba la τ de activación de las corrientes Kv10.1 medidas a 0 mV, con valores control de 4.28 ± 0.59 ms y en presencia del NS1643 de 3.99 ± 0.66 ($P > 0.05$, prueba t-Student pareado; $n = 8$) (**Fig. 11B**).

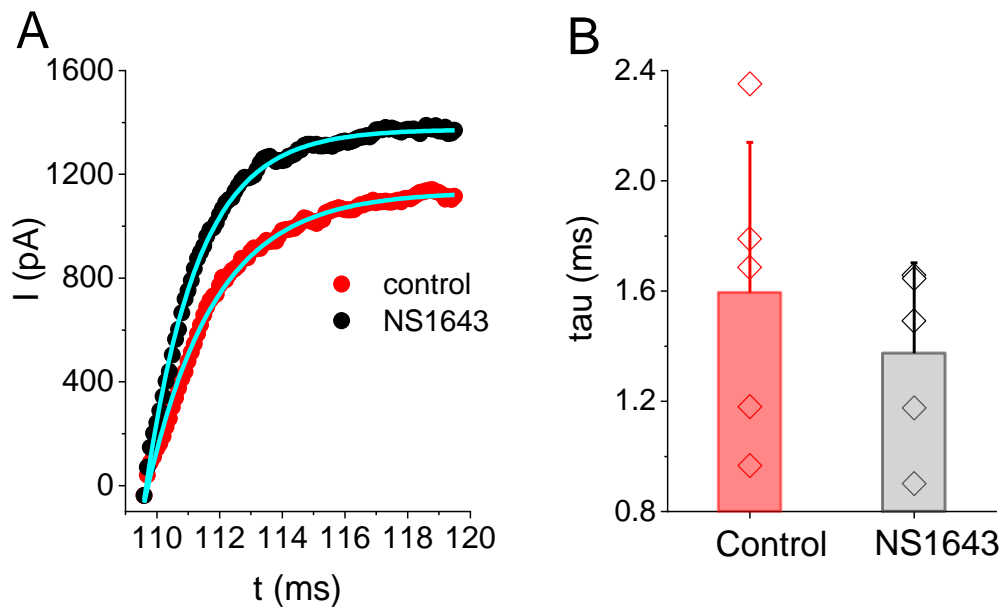


Figura 11. Efecto del NS1643 sobre la velocidad de activación las corrientes Kv10.1. A) trazo representativo del ajuste exponencial a las corrientes Kv10.1 en condición control (rojo) y con NS1643 (negro); la línea azul representa el ajuste exponencial. **B)** Grafica de barras con los valores de tau en situación control (rojo) y con NS1643 (negro). El valor de tau en cada célula está representado por rombos.

Debido a que el NS1643 producía un efecto potenciador cuasi instantáneo no fue posible obtener las curvas I-V para esa situación experimental. Por tal razón, se eligió usar una rampa de voltaje de -100 a +50 mV (con una duración de 1 s, partiendo de un voltaje de mantenimiento de -70 mV) para ensayar el NS1643 a 100 μ M, y de esta forma cubrir todos los rangos de voltaje para construir la gráfica IV (**Fig. 12B**). De forma similar a lo observado en experimentos previos con los pulsos de voltaje a 0 mV, el NS1643 producía un primer efecto potenciador,

seguido de un efecto inhibitorio (**Fig. 12A**). En la gráfica del curso temporal se puede observar que a 0 y +50 mV se produce un incremento transitorio en la amplitud de la corriente cuando se añade el NS1643 en el baño, seguido de un efecto inhibitorio (**Fig. 12A-B**); la corriente se recupera lentamente durante el lavado. En esta serie de experimentos se cuantifico la corriente en 3 valores de voltaje, a -100, 0 y +50 mV; sin embargo, durante la fase de potenciación únicamente la corriente medida a 0 mV resulto ser estadísticamente significativa, con un incremento de 1.5 veces de su amplitud, de 1.06 ± 0.25 nA en control a 1.41 ± 0.26 nA con NS1643 a $100\mu\text{M}$ ($P < 0.001$; $n = 5$) (**Fig. 12C**), dicho cambio fue similar al reportado con el protocolo de pulso fijo. Durante la fase inhibitoria, los valores de corriente a 0 y +50 mV resultaron ser aproximadamente 80% más pequeños que sus valores control; a 0 mV el corriente control fue de 1.41 ± 0.26 nA y con NS1643 a $100\mu\text{M}$ la corriente cambió a 0.16 ± 0.04 nA ($P < 0.05$; $n = 5$) y a +50 mV de 3.05 ± 0.59 nA en control a 0.55 ± 0.14 nA con NS1643 a $100\mu\text{M}$ ($P < 0.05$; $n = 5$) (**Fig. 12D**).

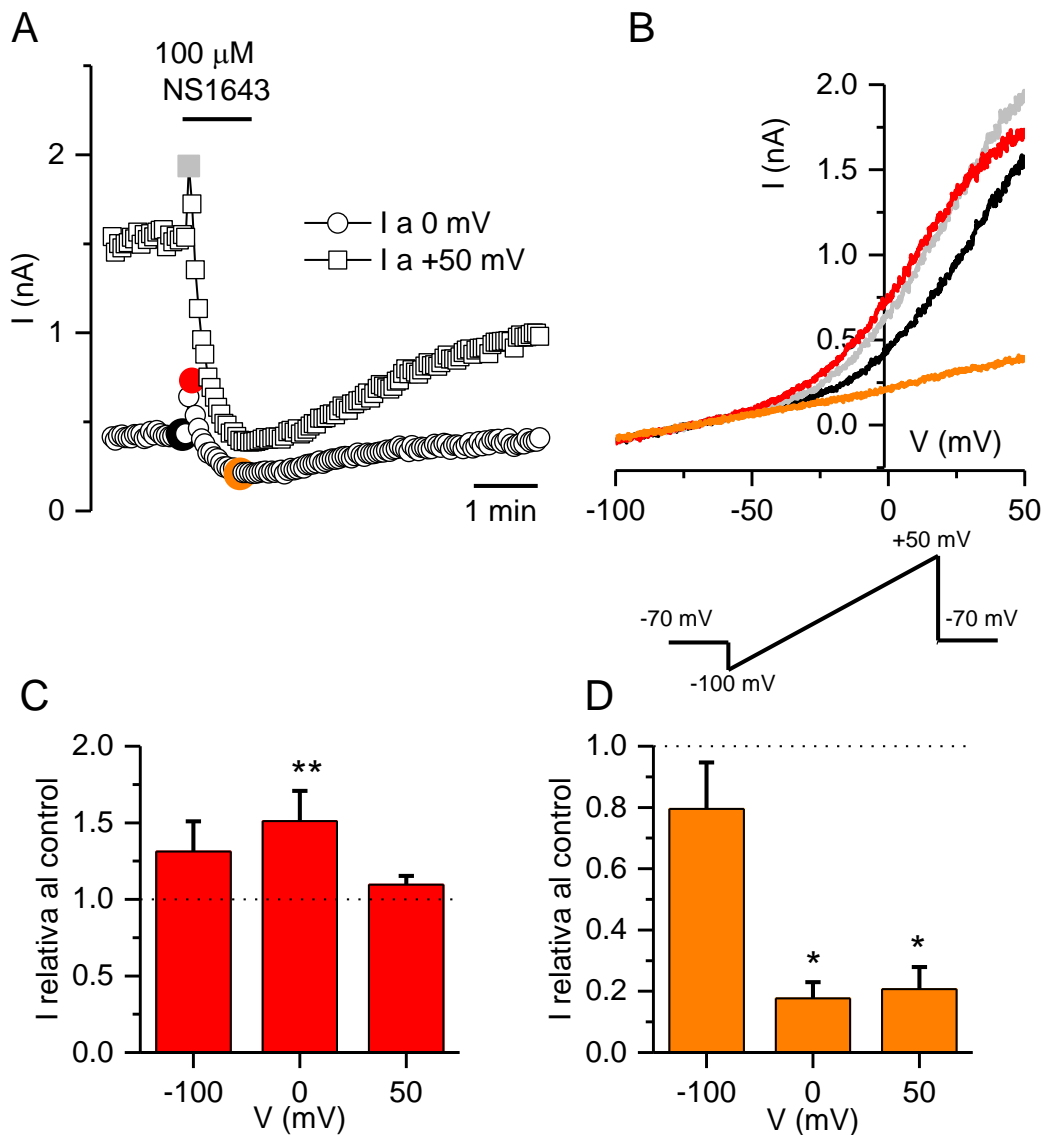


Figura 12. Efecto del NS1643 sobre las corrientes Kv10.1 generadas por rampas de voltaje. A) Curso temporal de la corriente Kv10.1 medida a 0 mV (círculos) y +50 mV (cuadrados), en ausencia y presencia de NS1643 a 100 μ M. Los círculos rellenos se corresponden a las corrientes del mismo color graficadas en B. **B)** Curvas I-V instantánea obtenida por un protocolo de rampa, en las condiciones experimentales de control (negro), máximo efecto potenciador a +50 mV (gris), máximo efecto potenciador a 0 mV (rojo) y máximo efecto inhibitorio observado (naranja). Debajo de la I-V se puede observar un ejemplo de la rampa de voltaje aplicada. **C)** Grafica de barras del efecto potenciador del NS1643 sobre la corriente Kv10.1 medida a -100, 0 y +50 mV. Los datos se encuentran normalizados respecto al valor de corriente control. **D)** Grafica de barras del efecto inhibitorio del NS1643 sobre la corriente Kv10.1 medida a -100, 0 y +50 mV. Los datos se

encuentran normalizados respecto al valor de corriente control. En C y D las líneas punteadas representan el control normalizado. $n = 5$. * = $P < 0.01$; ** = $P < 0.05$.

6.6. El efecto del PD-118057 sobre las corrientes Kv10.1.

El compuesto PD-118057 se ensayó a tres concentraciones (1, 10 y 100 μM) (**Fig. 13**). Como en experimentos previos, se utilizó un pulso fijo a 0 mV. El compuesto a 1 y 10 μM no causó cambios estadísticamente significativos en la amplitud de las corrientes producidas por las células HEK-Kv10.1 (1 μM : de 1.01 ± 0.27 nA en control a 1.04 ± 0.28 nA en presencia de PD-118057; 10 μM : de 0.91 ± 0.20 nA en control a 0.95 ± 0.22 nA con PD-118057). A 100 μM el compuesto causó una potenciación, la cual se estableció después de 2 minutos de aplicación y que fue estadísticamente significativa ($P < 0.05$; $n = 5$), observando un aumento de 1.3 veces, de 0.64 ± 0.12 nA en situación control a 0.88 ± 0.17 nA en presencal del PD- 118057. Debido a que sólo se observaron efectos a concentraciones muy altas decidimos descartarlo para futuros experimentos.

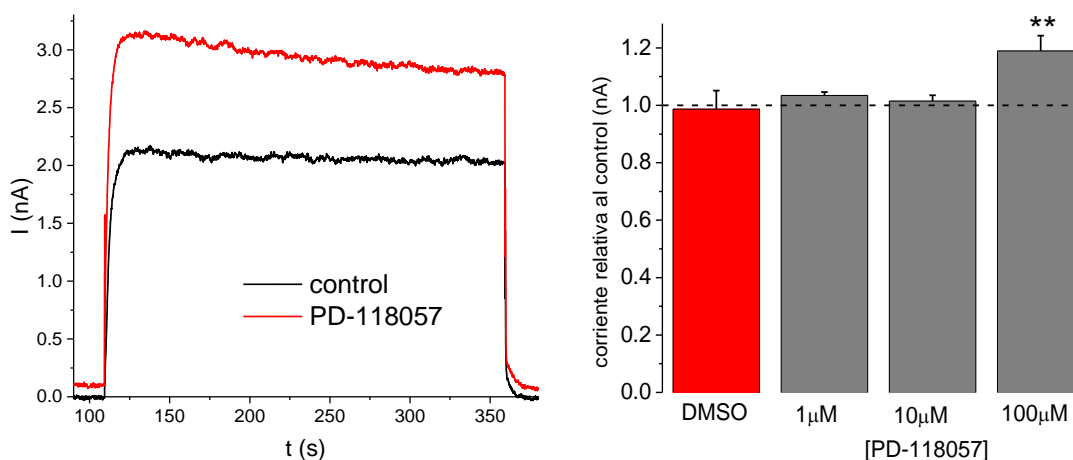


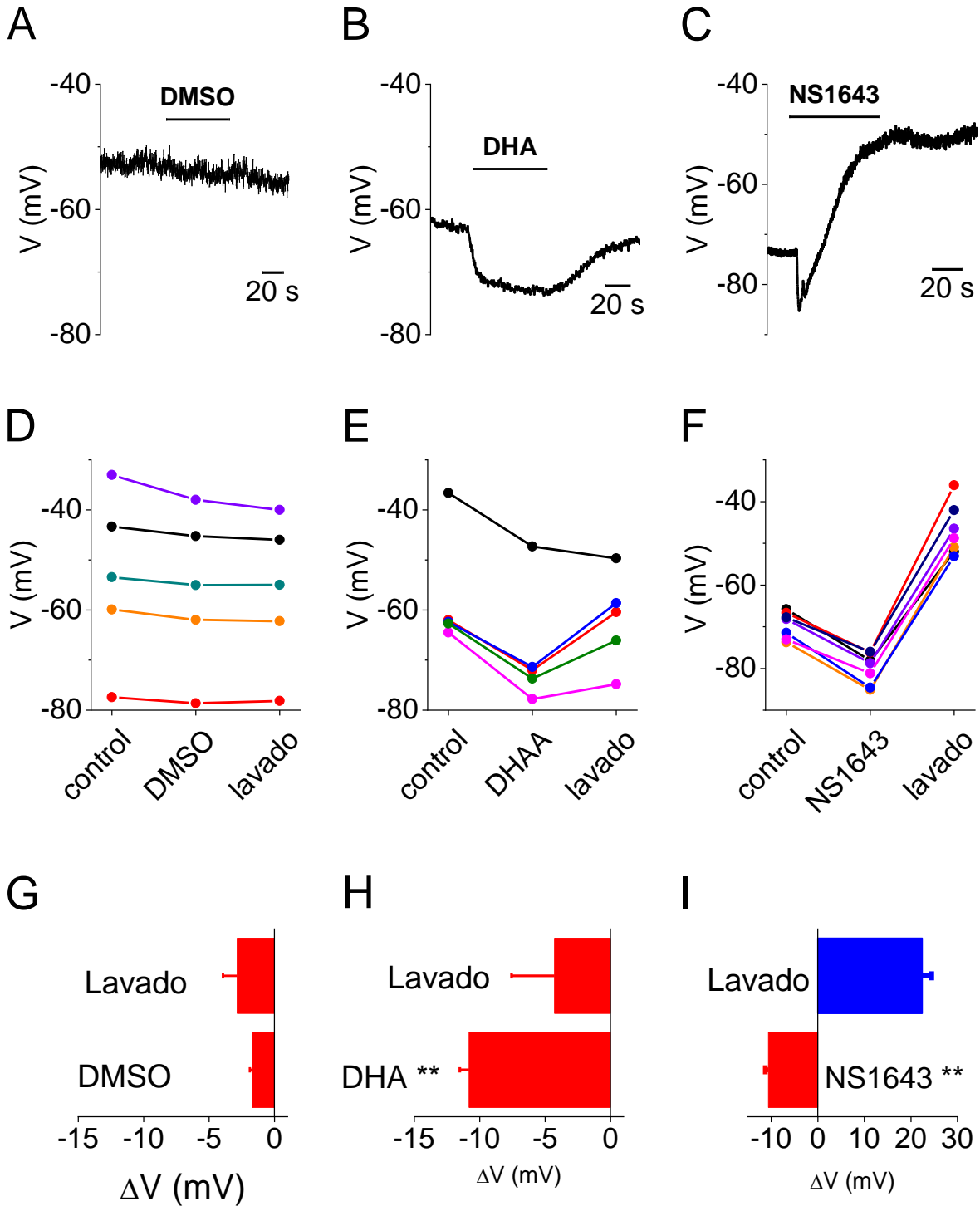
Figura 13. Efecto del PD-118057 sobre las corrientes Kv10.1. A) Trazo representativo del efecto del PD sobre las corrientes Kv10.1; la corriente fue generada con un pulso a 0 mV. El trazo control se esquematiza de color negro y el trazo con el PD-118057 en color rojo. B) Gráfica de barras con los efectos promedio del PD a 3 diferentes concentraciones sobre las corrientes Kv10.1. DMSO en color rojo. Los datos se encuentran normalizados respecto al valor de corriente control. Sólo a 100 μM ($P < 0.05$) el cambio de amplitud fue significativo. La $n = 4$ a las tres concentraciones. ** = $P < 0.05$.

6.7. El efecto de los compuestos sobre el PMR de las células HEK-Kv10.1.

Para corroborar que la apertura o potenciación del Kv10.1 por el DHA y el NS1643 tuvieran efecto sobre el PMR en las células que expresaban el canal Kv10.1, se realizaron experimentos de fijación de corriente. El protocolo de registro para estos experimentos consistió en registrar el PMR libre (sin inyección de corriente) de las células HEK-Kv10.1; cuando el PMR fue lo suficientemente estable se adiciono el compuesto de interés y se mantuvo así durante un minuto, para posteriormente realizar el lavado del compuesto. El DMSO (el vehículo en que se disuelven los compuestos) a una concentración de 0.1% no produjo un cambio sobre el PMR de las células, siendo de -58.5 ± 7.2 mV en promedio en situación control y de -60.2 ± 7.0 mV en promedio con DMSO ($P > 0.05$, t-test pareada; $n = 4$). (**Fig. 14A, D y G**).

En cambio, la aplicación del DHA (100 μ M) causó que el PMR se hiperpolarizara de forma estadísticamente significativa, pasando de -57.64 ± 5.27 mV en promedio en control a -68.44 ± 5.40 mV en promedio con el DHA ($P < 0.01$, t-test pareada; $n = 5$), causando en promedio una diferencia de potencial o delta (Δ mV) de -10.8 ± 0.71 con respecto al PMR antes de aplicar el compuesto (**Fig. 14B, E y H**), el efecto hiperpolarizante fue parcialmente reversible durante el lavado.

La aplicación de NS1643 (100 μ M), al igual que en los experimentos de fijación de voltaje, produjo un efecto bifásico sobre el PMR, primero ocasionando una hiperpolarización rápida del PMR y posteriormente una depolarización lenta del mismo. La hiperpolarización del PMR fue estadísticamente significativa, pasando de -68.10 ± 1.76 mV en promedio en situación control a -78.69 ± 1.78 mV en promedio con el NS1643 ($P < 0.01$, prueba t-Student pareada; $n = 7$) (**Fig. 14C, F e I**), produciendo una Δ mV de -10.59 ± 2.82 mV con respecto a PMR antes de aplicar el compuesto. Cuando medimos el PMR antes de comenzar el lavado, el valor obtenido fue de -47.07 ± 2.31 mV, lo que representaba una depolarización de 22.45 ± 2.64 mV respecto al control (**Fig. 14C, F e I**). Durante la fase de lavado, el PMR no regreso a los valores iniciales, manteniéndose depolarizado durante esta fase.



Hiperpolarización **Depolarización**

Figura 14. Efecto de los compuestos potenciadores sobre el PMR de las células HEK-Kv10.1. A, B y C) Registro representativo del efecto del DMSO (0.1%), DHA (100 μ M) y NS1643 (100 μ M) sobre el PMR de las células HEK-Kv10.1, respectivamente. **D, E y F)** Valores de potencial de membrana de cada una de las células registrada durante las condiciones control, tratamiento y lavado. De izquierda a derecha: DMSO, DHA y NS1643. **G, H e I)** Gráficas de los cambios promedio en el potencial de membrana (Δ mV) durante la aplicación de los compuestos (de izquierda a derecha: DMSO, DHA y NS1643) y durante la fase de lavado. Los cambios o diferencias del potencial están calculados con respecto al PMR obtenido antes de la aplicación de cada compuesto. Una hiperpolarización del PMR se representa en rojo y una depolarización en azul. NS1643 n = 7, DHA n = 5, DMSO n = 5. ** = P<0.05.

Debido al efecto significativo del DHA y del NS1643 sobre las corrientes iónicas generadas por el Kv10.1 y su impacto en el PMR, se decidió evaluar si estos cambios eran capaces de afectar parámetros tales como la viabilidad, migración y proliferación celular.

6.9. Ensayo de viabilidad.

Para estos ensayos se estudió la emisión simultánea de 2 fluoróforos, la calceína-AM (que emite fluorescencia en el rango naranja-rojo) y el DAPI. El fundamento de la técnica se basa en que la calceína únicamente emite fluorescencia cuando la membrana de las células esta íntegra (y por tanto las células están vivas); como la calceína se encuentra acoplada a un grupo acetometilester (AM), esta puede atravesar la membrana plasmática por difusión, una vez dentro de la células las enzimas esterases cortan el grupo AM y dejan libre la región fluorescente de la molécula que ahora es impermeable a la membrana. En el caso del DAPI, esta es una molécula fluorescente que se une a secuencias de DNA en el núcleo; debido a que el DAPI no puede atravesar la membrana plasmática cuando la célula está viva, únicamente puede unirse a regiones del DNA cuando la membrana plasmática se encuentra comprometida, lo que sucede en células muertas.

En total se consideraron ocho condiciones experimentales que incluyeron: el control positivo, Triton-100X (0.1%), DMSO (0.1%), astemizol (10 μ M), NS1643 a 10 y 100 μ M y con DHA a 10 y 100 μ M. En las **Figs. 15 y 16** se observan imágenes representativas del ensayo de viabilidad en células CHO-Kv10.1. Para cada condición se muestran las células en campo claro y también expuestas a la

longitud de onda de excitación de cada fluoróforo (calceína y DAPI) y captando la imagen con el filtro respectivo para la captación de luz de emisión de cada sonda fluorescente y la superposición de calceína más DAPI. El conteo y el análisis de porcentaje de células vivas/muertas fue obtenido de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. En la **Fig. 17** se muestra la distribución en porcentaje de células vivas y muertas en cada condición. Como control positivo de células muertas se utilizó Tritón X-100 (0.1%), un surfactante el cual actúa como detergente y por lo cual es capaz de romper la continuidad de la membrana, y por tanto produce muerte celular y la entrada del DAPI. En las células CHO-Kv10.1 tratadas con Tritón el porcentaje de células marcadas con DAPI es de $99.67 \pm 0.22\%$ y en células CHO-WT es de $96.55 \pm 2.84\%$, con lo cual hay seguridad del marcaje de células muertas por el DAPI y de la ausencia de fluorescencia para calceína. Para poder saber si la viabilidad celular cambia con los tratamientos, sus resultados se tienen que comparar con la viabilidad celular en condiciones normales de crecimiento. En ambas líneas celulares, en condiciones normales el porcentaje de células vivas es de $95.02 \pm 1.96\%$ y de $98.01 \pm 17\%$, para CHO-Kv10.1 y CHO-WT, respectivamente. Este porcentaje de viabilidad no cambia en presencia del vehículo DMSO. El bloqueador clásico de Kv10.1, el astemizol (IC_{50} reportado de 196 nM) (García-Ferreiro, R. E. *et al.*, 2004), produjo un incremento significativo de células muertas en ambas líneas celulares, lo que concuerda con lo descrito en la literatura. En el caso de los tratamientos con el astemizol (10 μ M), se observó que a las 24 horas había una considerable reducción en la cantidad de células vivas: el astemizol maltrataba y en muchos casos desintegraba la membrana celular por lo cual su detección por medio de los fluoróforos fue complicada y esta variación del marcaje de células o restos de células se ve reflejado en un error de la media más amplio. Ni el NS1643 ni el DHA, a ninguna concentración ensayada, produjo un cambio estadísticamente significativo sobre la viabilidad celular. Los porcentajes de vivas/muertas para condición se encuentran en la **Tabla 3** y **Fig. 17**.

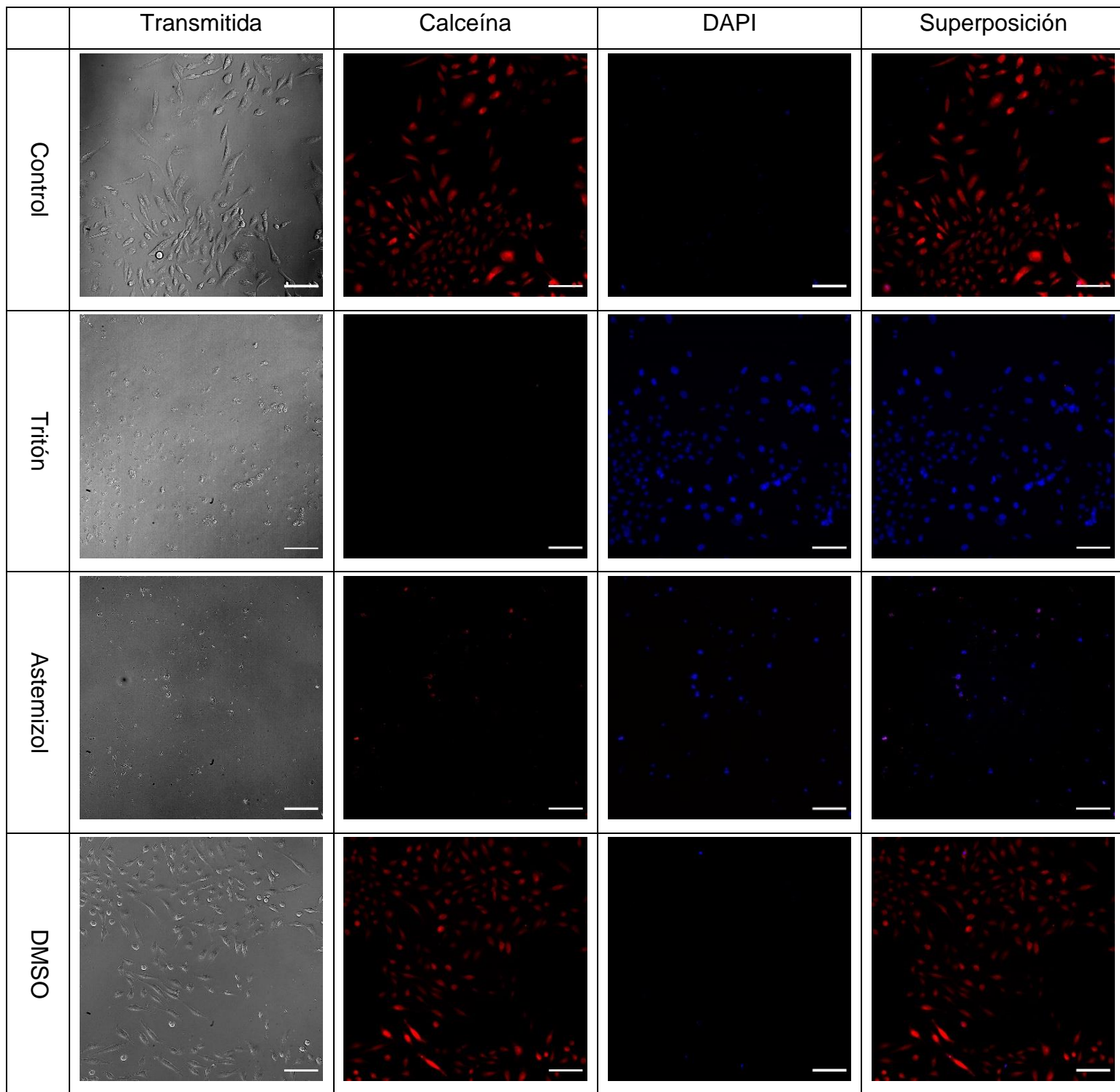


Figura 15. Ensayo de viabilidad de células CHO-Kv10.1. Condiciones control. Imágenes representativas en cada condición. Se muestra la imagen con luz transmitida, las células marcadas con calceína detectadas usadas en filtro Texas Red, las células marcadas con DAPI y la superposición del canal Texas Red y DAPI. La barra de color blanco en cada imagen representa 100 micrómetros.

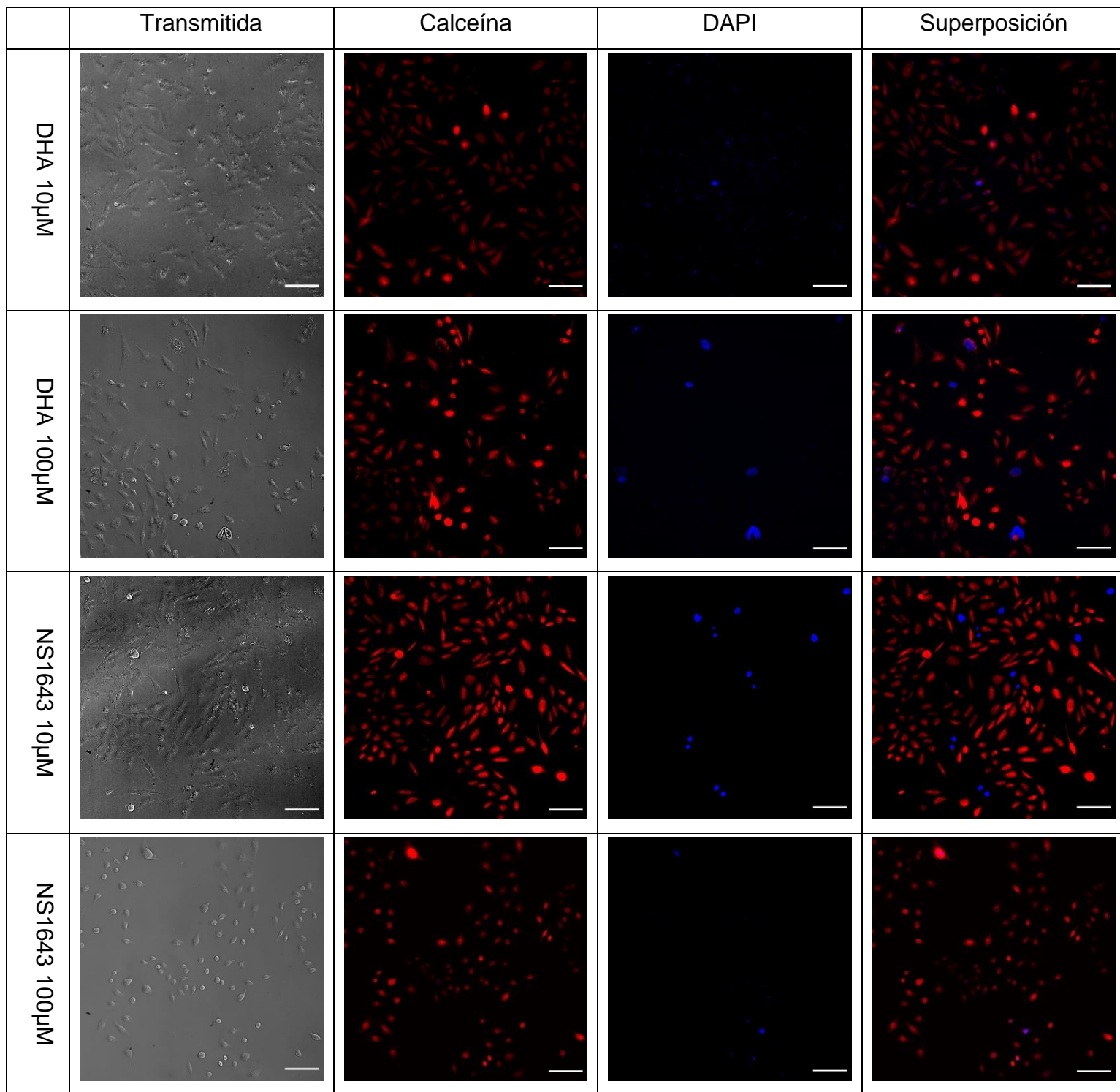


Figura 16. Ensayo de viabilidad de células CHO-Kv10.1 con las moléculas de interés. Imágenes representativas en cada condición. Se muestra la imagen con luz transmitida, las células marcadas con calceína detectadas usadas en filtro Texas Red, las células marcadas con DAPI y la superposición del canal Texas Red y DAPI. La barra representa 100 micrómetros.

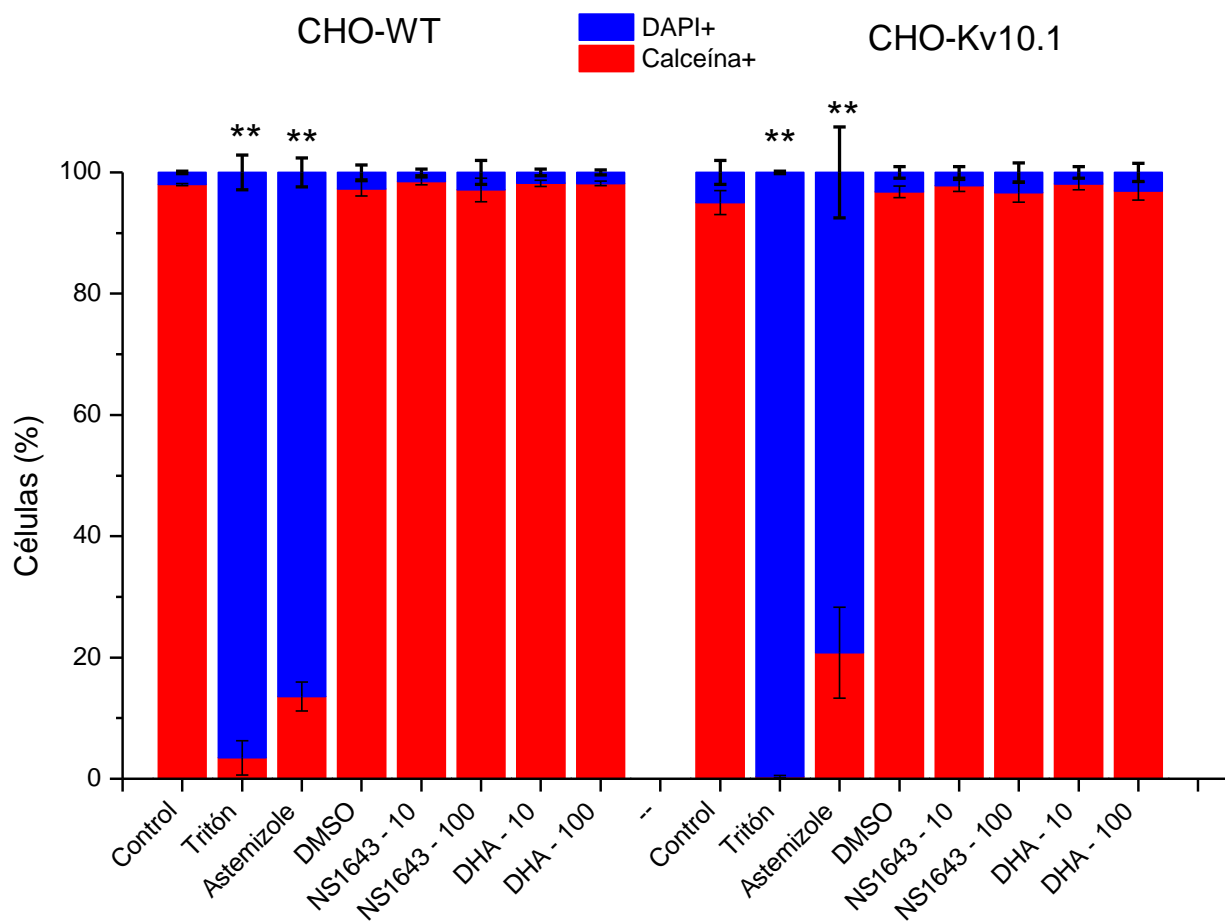


Figura 17. Ensayo de viabilidad. Distribución en porcentaje de células muertas y vivas en porcentaje en células CHO-WT y CHO-Kv10.1. CHO-WT n = 4, CHO-Kv10.1 n = 5. ** para P<0.05 con una ANOVA de una vía y prueba post hoc Tukey para comparar los tratamientos con la situación control.

	CHO-WT					CHO-Kv10.1			
	Dapi+	Calceina+	n	P		Dapi+	Calceina+	n	P
Control	1.98 ± 0.17	98.014 ± 0.17	4	<0.05		4.97 ± 1.96	95.02 ± 1.96	5	<0.05
Tritón	96.55 ± 2.84	3.44 ± 2.84	4	>0.05		99.67 ± 0.22	0.32 ± 0.22	5	>0.05
DMSO	2.70 ± 1.20	97.29 ± 1.20	4	<0.05		3.21 ± 0.95	96.78 ± 0.95	5	<0.05
NS1643 (10 µM)	1.46 ± 0.57	98.53 ± 0.57	4	<0.05		2.20 ± 0.93	97.79 ± 0.93	5	<0.05
NS1643 (100 µM)	2.88 ± 1.96	97.11 ± 1.96	4	<0.05		3.35 ± 1.55	96.64 ± 1.55	5	<0.05
DHA (10 µM)	1.80 ± 0.52	98.19 ± 0.52	4	<0.05		1.91 ± 0.97	98.08 ± 0.97	5	<0.05
DHA (100 µM)	1.83 ± 0.37	98.16 ± 0.37	4	<0.05		3.05 ± 1.51	96.94 ± 1.51	5	<0.05
Astemizol (10µM)	86.44 ± 2.39	13.55 ± 2.39	4	>0.05		79.19 ± 7.47	20.83 ± 7.47	5	>0.05

Tabla 3. Porcentaje de células en cada condición. Valores de P obtenidos con una prueba de contingencia, donde se compara cada tratamiento vs el control.

6.10. Ensayo de migración (Ensayo de cierre de herida).

Como se mencionó en la sección de métodos, el efecto que las moléculas de interés podrían tener sobre la migración celular se estudió con el ensayo del cierre de la herida. Como controles se establecieron tratamientos con diferentes concentraciones de SFB (5%, 10% y 20%). Se evaluó astemizol (10 μ M), el cual se ha comprobado que disminuye la proliferación de células que sobreexpresan el Kv10.1 y los compuestos DHA (10 μ M) y NS1643 (10 μ M). El ensayo se realizó tanto en la línea celular CHO-WT como en CHO-Kv10.1. Las imágenes de la herida fueron obtenidas del centro de la placa con la ayuda del microscopio invertido ImageXpress a las 0 y 24 horas. En las **Fig. 18, 19 y 20** se observan imágenes representativas en ambas líneas celulares, en las que se muestra la herida al tiempo inicial de 0 horas y transcurridas 24 horas, con las condiciones experimentales: control (10% SFB, que es porcentaje de suero empleado en los demás experimentos, a menos que se indique lo contrario), DHA y NS1643, respectivamente.

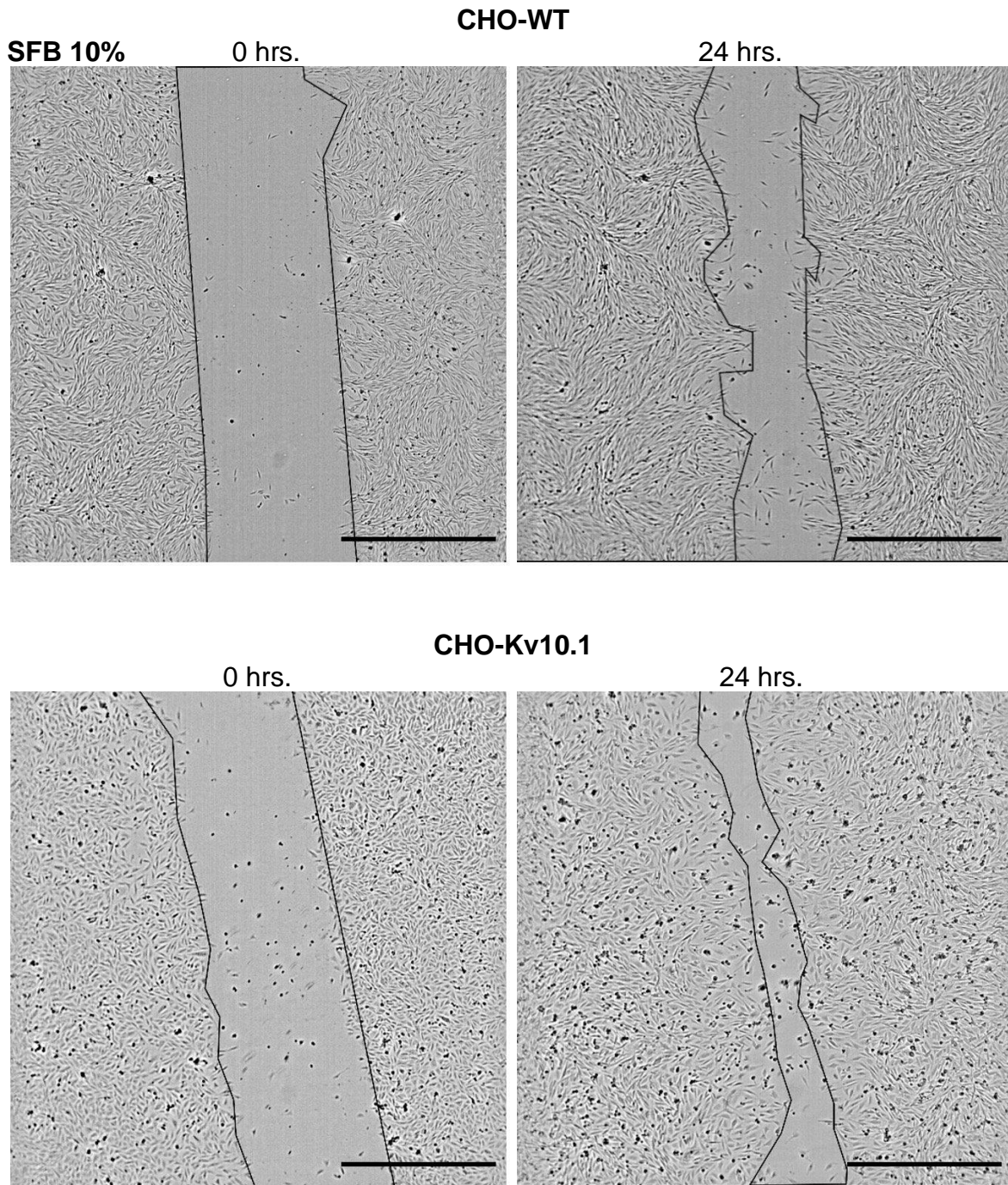


Figura 18. Ensayo de la herida. Tratamiento control (sólo SFB al 10%) en células CHO-Kv10.1 y CHO-WT. Herida a las 0 horas y reducción de herida a las 24 horas. Escala de barra = 1 mm.

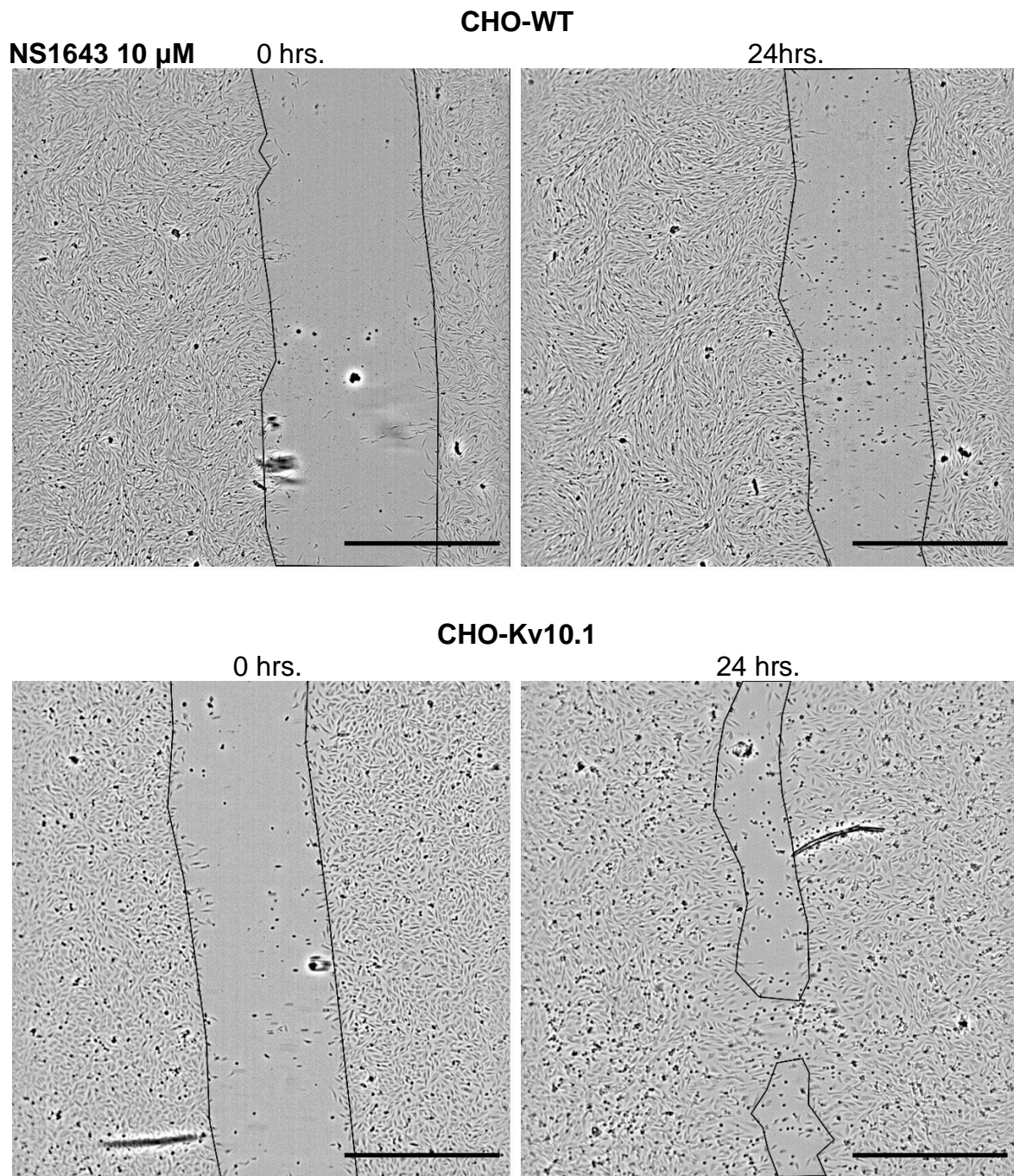


Figura 18. Ensayo de la herida. Tratamiento con NS1643 a 10 μ M en células CHO-Kv10.1 y CHO-WT. Herida a las 0 horas y reducción de herida a las 24 horas. Escala de barra = 1 mm.

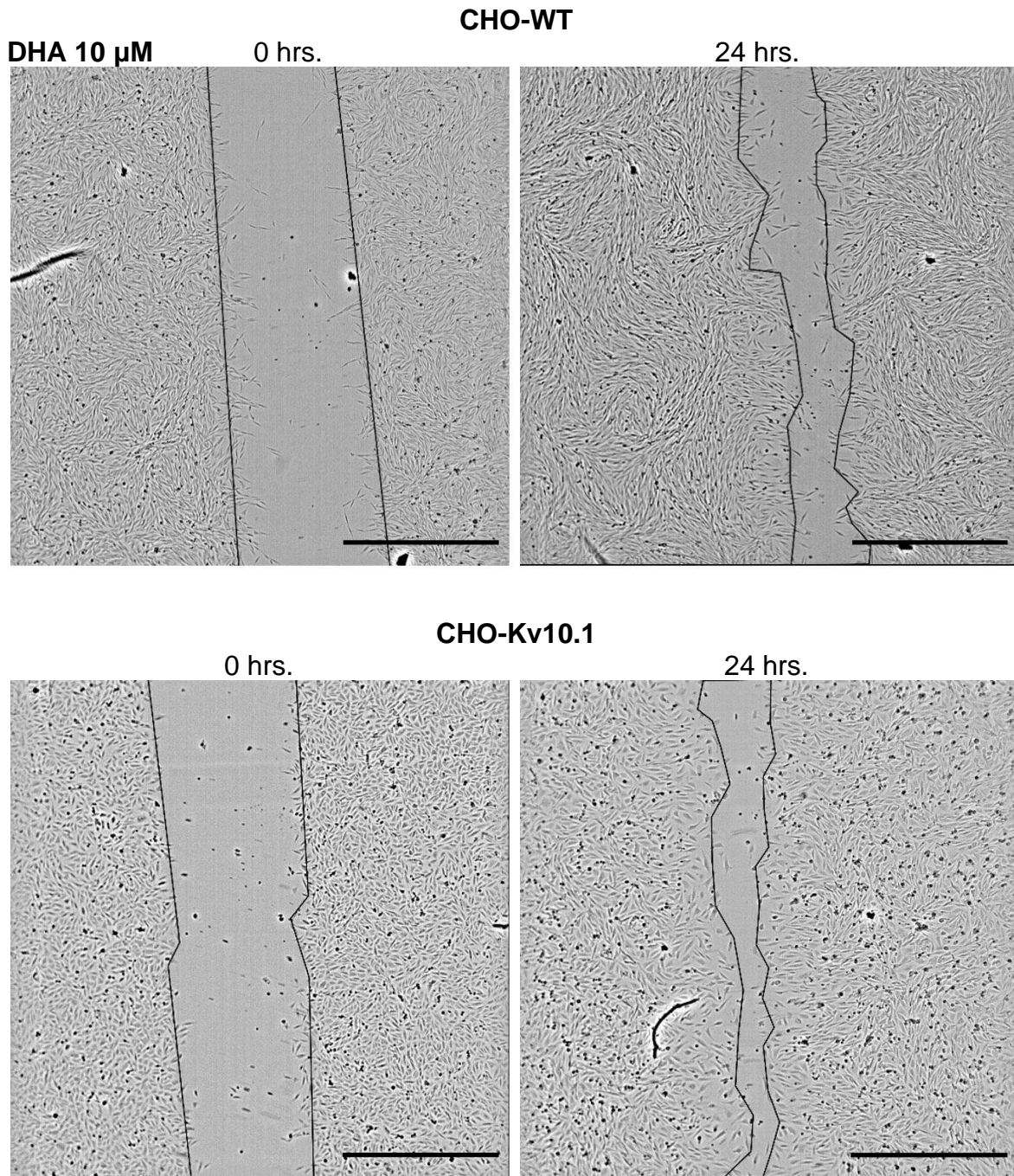


Figura 19. Ensayo de la herida. Tratamiento con DHA a 10 μM en células CHO-Kv10.1 y CHO-WT. Herida a las 0 horas y reducción de herida a las 24 horas. Escala de barra = 1 mm.

En las gráficas de barra de la **Fig. 21**, se representa el porcentaje de la herida que quedó sin cerrar a las 24 horas con respecto al tiempo inicial (0 h). En las células CHO-WT ninguno de los tratamientos afectó la velocidad del cierre de la herida. En el caso de las células CHO-Kv10.1, en presencia de SFB al 20%, éstas incrementaron la velocidad para sanar la herida con respecto al caso control (SFB al 10%).

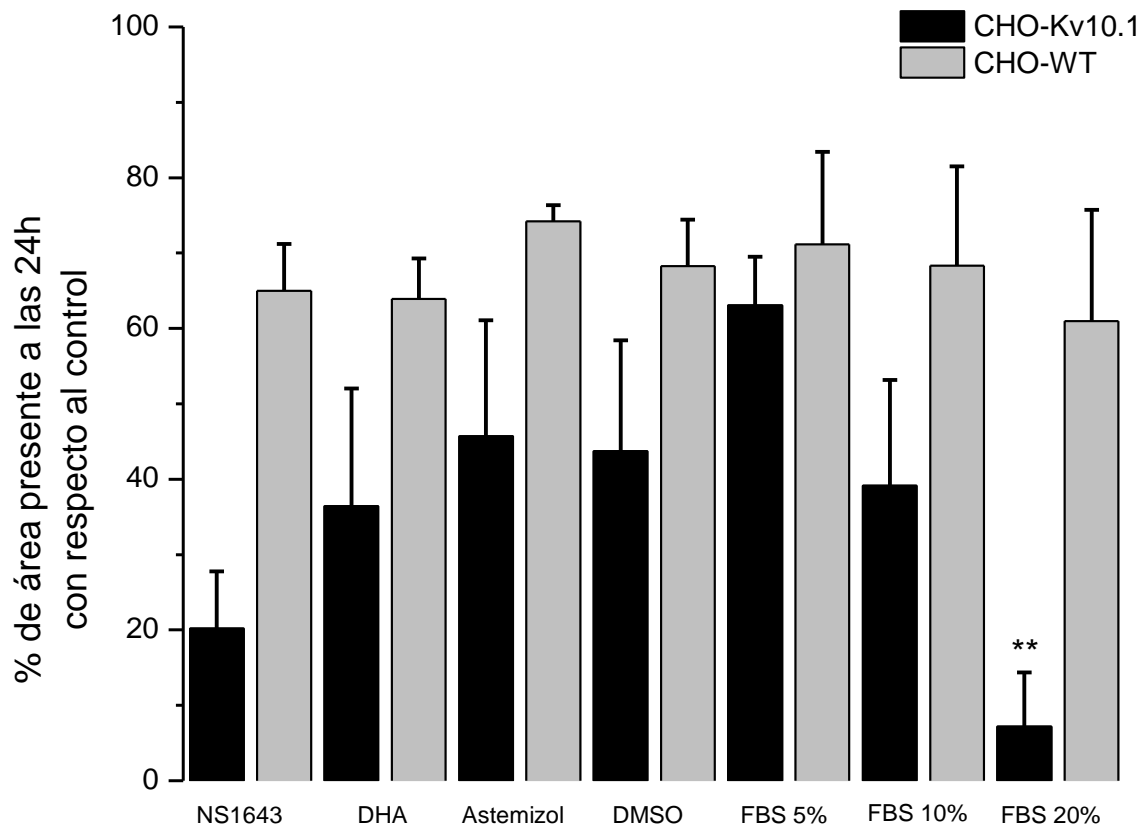


Figura 21. Ensayo de migración celular (Ensayo de la herida). Porcentaje del área de la herida sin cerrar a las 24 de los tratamientos respecto a las 0 horas. El 0% representa un cierre total de la herida y el 100% que no existió ningún cambio en el tamaño respecto al tiempo 0. Las barras en color negro y gris indican a las células CHO-Kv10.1 (n = 4) y CHO-WT (n = 3), respectivamente. ** para $P < 0.05$ con una ANOVA de una vía y prueba post hoc Tukey para comparar los tratamientos con la situación control (SFB 10%).

6.11. Ensayo de proliferación.

El efecto de los compuestos sobre la proliferación celular se estudió usando el ensayo de MTT. Se realizaron tres experimentos independientes de los cuales cada uno fue por triplicado. Como control negativo se utilizó astemizol el cual es un inhibidor clásico del canal Kv10.1 y el cual es reportado que disminuye la proliferación celular. Los compuestos a ensayar (NS1643 y DHA) se ensayaron a una concentración de 10 μM . Para que la confluencia celular de los pozos a los tres días fuera de alrededor de 80%, la concentración inicial de las células fue de 500 células por pozo. Los experimentos se llevaron a cabo tanto en la línea celular CHO-WT como en la CHO-Kv10.1. En la **Fig. 22** se muestra el curso temporal de la absorbancia relativa respecto al tiempo 0. En las células CHO-Kv10.1 a las 72 horas la absorbancia del tratamiento control fue de 1.77 ± 0.01 con respecto a las 0 horas, el del astemizol fue de 1.23 ± 0.08 , el del NS1643 1.76 ± 0.08 y el del DHA 2.01 ± 0.14 . En las células CHO-WT a las 72 horas la absorbancia del tratamiento control fue de $1.92 \pm 0.12\%$ con respecto a las 0 horas, el del NS1643 $1.85 \pm 0.21\%$ y el del DHA $2.18 \pm 0.22\%$. La proliferación celular fue disminuida de forma significativa en presencia de astemizol ($P < 0.05$). Las gráficas muestran que el DHA podría estar causando un aumento en la proliferación celular en ambas líneas celulares pero este cambio no es estadísticamente significativo.

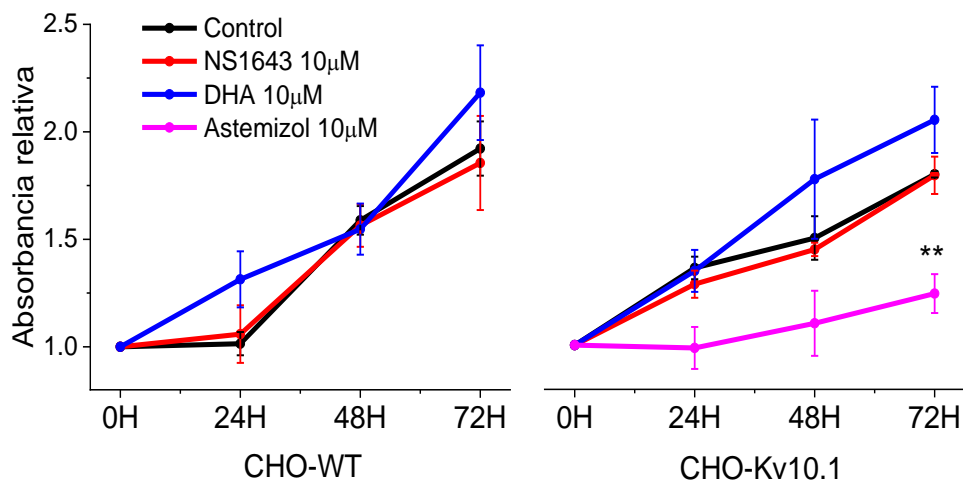


Figura 22. Ensayo de proliferación celular (Ensayo de MTT). Absorbancia relativa respecto al tiempo 0 horas a través del tiempo con mediciones cada 24 horas. Los datos representan una el promedio y SEM (error estándar de la media) de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. ** para $P < 0.05$ con una ANOVA de una vía y prueba post hoc Tukey para comparar los tratamientos con la situación control.

7. Discusión.

Los canales iónicos tienen la capacidad de permitir el flujo iónico a través de la membrana en función de su gradiente electroquímico, y se han revelado como componentes esenciales para mantener la homeostasis celular, ya sea en células sanas o afectadas por alguna patología. Cambios en su permeabilidad puede desencadenar la activación o detención de diversos procesos bioquímicos. Por ejemplo, sin conocer aun el mecanismo exacto, la sobreexpresión del canal Kv10.1 produce un cambio en el fenotipo de células normales hacia un fenotipo canceroso, caracterizado por alta tasa de proliferación y migración, entre otros (ejemplos en Chen J. *et al.*, 2020; Wu X. *et al.*, 2015; Wang X. *et al.*, 2018). Su importancia, ha hecho que la manipulación farmacológica de éste sea de vital importancia para intentar detener muchas de las propiedades oncogénicas asociadas a su expresión.

Los cambios en el potencial de membrana celular se han estudiados de manera más profunda en células excitables, sin embargo, el papel de éste en células no excitables es menos comprendida; no obstante, diversos trabajos muestran que los cambios en el potencial de membrana pueden estar asociados a diversas funciones biológicas, entre ellos el ciclo celular y por consiguiente la proliferación (Abdul Kadir L. *et al.*, 2018).

Las primeras observaciones que relacionaban los cambios de potencial de membrana con la actividad mitótica de las células reportaban que el PMR de las células de sarcoma se hiperpolarizaba antes de entrar a la fase de síntesis (S) del ciclo celular y se depolarizaba durante la mitosis (M), hipotetizando que el PMR se correlacionaba con la fase del ciclo celular (Cone, 1969). Posteriormente, se ha observado que hiperpolarizando el PMR hacia valores muy parecidos a los encontrados en neuronas, puede inducir un bloqueo mitótico en células CHO que se encuentren proliferando (Adams D. J. *et al.*, 1999; Cone & Tongier, 1971). Dada esta evidencia no fue raro que se hipotetizará que el PMR (a través de la actividad de diversos canales iónicos) pudiera estar implicado en la progresión maligna de células tumorales. Diversas comparaciones, tanto *in vitro* como *in vivo*, entre células normales contra células cancerígenas de diversos tejidos, han

mostrado que éstas últimas tienden a tener PMR más depolarizados. En células MCF-7, proveniente de tejido tumoral de mama, y la línea celular de neuroblastoma C1300, se observó que el PMR de las células se correlaciona con las fases del ciclo celular; cuando las células eran arrestadas en la transición de G1/S o G2/M el potencial de membrana se encontraba hiperpolarizado, mientras que si las células se arrestaban en la fase G0/G1 y en la fase de M las células estaban depolarizadas; por tanto, parece que la progresión del ciclo celular está acompañada de oscilaciones rítmicas del PMR, transitando entre estados hiperpolarizados y depolarizados (Yang & Brackenbury, 2013). Una investigación realizada por Zhou y colaboradores propone que una depolarización del potencial de membrana desencadena cambios en la distribución espacial del fosfolípido aniónico fosfatidilserina, los cuales promueven la formación de un agrupamiento con la proteína K-Ras, a través de interacciones electrostáticas; la formación de este agrupamiento es esencial para la activación de la proteína cinasa RAF, lo que incrementa la actividad de la cascada RAF-MAPK la cual está involucrada en procesos meióticos, mientras que la hiperpolarización del potencial tendría los efectos opuestos (Zhou Y. *et al.*, 2015).

La relevancia fisiológica del potencial de membrana se pone de manifiesto en diversas patologías, por ejemplo, las neuronales, en las cuales fenómenos de hiperexcitabilidad pueden ser desencadenados por un mal funcionamiento o disminución en la actividad de canales K⁺ (Lawson, 2000). En este tipo de condiciones cobra relevancia el estudio y uso de activadores u *openers* de canales de K⁺, los cuales podrían contrarrestar la pérdida de actividad de canales de K⁺ con una subsecuente recuperación del PMR a valores más negativos. Esta estrategia de poder modular el potencial de membrana para resolver patologías ha llevado a encontrar compuestos como la retigabina, la cual activa los canales de la subfamilia Kv7 (KCNQ1-7), hiperpolarizando el PMR de ovocitos de *Xenopus laevis* que expresaban las subunidades KCNQ2/3 de -63 mV a -85 mV en presencia de 100 μM de retigabina (Gunthorpe M. J. *et al.*, 2012). Nuevos compuestos derivados de la retigabina, como por ejemplo el XEN1101 se

encuentran en ensayos clínicos de fase 2 para terapia complementaria en la epilepsia focal (Bialer M. et al., 2018).

7.1. El DHA y el NS1643 favorecen la actividad del canal Kv10.1.

Las primeras series experimentales mostraron que las líneas celulares HEK-WT y HEK-Kv10.1 tienen propiedades electrofisiológicas muy diferentes. Las corrientes macroscópicas registradas en las células HEK-WT difirieron, tanto en cinética como en amplitud, en comparación con las registradas en las HEK-Kv10.1, las cuales tuvieron las sig. características: activación dependiente de voltaje (activándose cerca de los -50 mV) y la nula inactivación de la corriente (al menos hasta los 250 ms que dura el pulso activador), familias de curvas I-V que generaron corrientes rectificantes de salida y $V_{1/2}$ de activación de +18.7 mV. Todas estas características similares a las encontradas en la literatura (Gómez-Lagunas F. *et al.*, 2019; Whicher & McKinnon, 2016; Whicher & McKinnon, 2019). Estas características, junto con el hecho de que las células HEK-WT tuvieron un PMR mucho más depolarizado que el de las HEK-Kv10.1, nos indicaba que efectivamente, las células HEK-Kv10.1 expresan el canal de forma funcional.

El PMR más hiperpolarizado en las células HEK-Kv10.1, respecto las WT, indicaba la presencia de una conductancia que responde a un potencial de inversión negativo. En nuestras condiciones experimentales, el potencial de equilibrio teórico del potasio fue de aproximadamente -83 mV (a temperatura ambiente), lo que estaría provocando el PMR más negativo en las células HEK-Kv10.1 y lo que nuevamente demuestra la expresión funcional del canal Kv10.1. Además, ninguna de las tres moléculas moduladoras de canales de K⁺ ensayadas incrementaron las corrientes endógenas expresadas en las células WT, por lo que tenemos la certeza de que no se ha sobreestimado ningún efecto sobre las corrientes Kv10.1.

En esta tesis mostramos por primera vez que los fármacos DHA y NS1643 son capaces de activar (potenciar) las corrientes generadas por el canal Kv10.1 y que a su vez son capaces de hiperpolarizar el PMR de las células donde se expresa. El DHA produce un efecto potenciador el cual es dependiente de la concentración,

y que además desplaza el $V_{1/2}$ de activación hacia valores de potencial de membrana más negativos, de +18.7 mV en situación control a -22.7 en presencia de DHA, lo que indica la apertura de canales Kv10.1 a voltajes más negativos de lo que normalmente lo hacen. A 100 μ M, el DHA incrementaba la amplitud de las corrientes 2.7 veces; esta potenciación es mayor que la conseguida por el NS1643 (a la misma concentración), la cual fue de 1.5 veces. La potenciación producida por el NS1643 sobre el Kv10.1 fue similar a la reportada para canales hERG (Kv11.1) la cual fue de alrededor de 2 veces, ambos a 100 μ M (Hansen R. *et al.*, 2005), mientras que en el hERG2 (Kv11.2) la potenciación fue de alrededor de 3 veces (Elmedyb P. *et al.*, 2007); en los canales hERG3 (Kv11.3), 10 μ M de NS1643 produjo una potenciación mayor (1.5 y 2 veces) que a concentraciones más altas, efecto que dio el adjetivo de agonista parcial al NS1643 (Bilet A. & Bauer C. K., 2012). En el caso del DHA se ha visto que a 100 μ M activa canales Shaker (Ottosson N. E., *et al.*, 2015), también se ha reportado que 10 μ M de esta molécula puede incrementar hasta 4 veces las corrientes en los canales de K⁺ del tipo BK (Ohwada T. *et al.*, 2003), lo cual es el doble comparado con los resultados aquí obtenidos sobre el Kv101.1 a una concentración 10 veces mayor.

Los efectos bifásicos obtenidos con el NS1643, tanto en fijación de voltaje como en fijación de corriente, hacen suponer que este compuesto ejerce sus efectos en sitios diferentes a los del DHA. En los registros de corriente en presencia del NS1643, tanto la inhibición como la potenciación fueron dependientes de la concentración, sin embargo, el efecto inhibitor mostró un cambio mayor con respecto al control. Un efecto bifásico también se ha reportado sobre la subfamilia hERG (Kv11.1, Kv11.2, Kv11.3). Cuando el NS1643 se aplicaba a concentraciones de 10 y 30 μ M se incrementaba las corrientes, pero al usar concentraciones más altas (100 μ M) se reducía la actividad sobre el canal con respecto a cuando se aplicaba 10 y 30 μ M. Usando mutantes del canal hERG se descubrió que el NS1643 probablemente bloquea al canal al interactuar con el residuo F656 (localizado en S6), actuando de esta forma como un bloqueador débil y por lo tanto considerándolo como un agonista parcial (Casis, O., 2006). La IC_{50} descrita en este trabajo fue de aproximadamente 19 μ M que es poco más del

doble que el encontrado por nosotros que es de aproximadamente 7 μ M. Debido a la homología estructural entre el Kv10.1 y el hERG1 es probable que existan residuos de aminoácidos que se conservan en ambos canales y los cuales producirían estos efectos. Al alinear las secuencias del canal hERG1 con las del Kv10.1 se encuentra que este aminoácido, el F656, está conservado en la misma posición estructural en ambos canales.

```
SP|Q12809|KCNH2_HUMAN YFTFSSLTSVGFVGNVSPNTNSEKIFFSICVMLIGSLMYASIFGNVSAIIQRLYSGTARYHT 675
SP|O95259|KCNH1_HUMAN YFTMTSLTSVGFVGNVAPSTDIEKIFAVAIMMIGSLLYATIFGNVTTIFQQMYANTNRYHE 514
***:*****:*.*: *****:..*:*****:***:*****:*.*:*.:. * **
```

Así, es posible que el NS1643 a través de la interacción con este aminoácido ocasione parte de los efectos observados sobre la cinética del canal.

En el canal Kv11.1 se ha propuesto que el NS1643 se une a los estados cerrados tempranos y al estado abierto (Perissinoti L. *et al.*, 2015). En canales hERG se confirmó que la unión del NS1643 ocurre del lado extracelular y que aplicado intracelularmente no provoca cambios en las corrientes. Además, se propuso que el sitio de unión ocurre en el vestíbulo exterior cerca del poro del canal (Xu, X., 2008), potencialmente en la interfaz del residuo L529 que se localiza en la S4, que es el sensor de voltaje (Guo J. *et al.*, 2015).

En el caso del DHA, este parece seguir un mecanismo de acción similar al que ejerce sobre otros canales de K⁺, por ejemplo, los tipos BK. Compuestos como el DHA, tienen una estructura de 3 anillos, por lo que muy probablemente actúan sobre los canales iónicos al igual que lo hacen los PUFAs (Silverá Ejneby M. *et al.*, 2018). El mecanismo de acción propuesto para los PUFAs y los ácidos resínicos, como el DHA, es que actúan sobre el sensor de voltaje de diferentes canales de potasio. Estas moléculas contienen una porción hidrofóbica compuesta por los anillos hidrocarbonados junto con los grupos metilo, pero es la porción cargada negativamente (el ácido carboxílico) de los PUFAs que atrae a los aminoácidos cargados positivamente del sensor de voltaje (S4), causando un movimiento de atracción (hacia el lado extracelular) y rotando a la subunidad S4 y como consecuencia facilitando la apertura del poro (Ottosson N. E. *et al.*, 2015). Ambos,

PUFAs y ácidos resínicos parecen requerir un ancla hidrofóbica, para unirse a la membrana, y una carga negativa para ejercer sus efectos vía un mecanismo electrostático (Silverå Ejneby M. *et al.*, 2018). El DHA se ha demostrado que activa al canal BK en forma dosis-dependiente (Ohwada T. *et al.*, 2003), lo mismo que con el canal Kv Shaker (Silverå Ejneby M. *et al.*, 2018). Un fenómeno parecido se ha descrito con el ácido araquidónico y el canal Kv10.1; este PUFA desplaza el voltaje medio de activación del canal hacia la izquierda (valores más negativos de potencial de membrana). El que el compuesto favorezca la apertura del canal a potenciales más negativos se relacionó con que la proliferación y actividad metabólica de las células de melanoma incrementara cuando las células fueron expuestas a concentraciones de 5 μ M (Gavrilova-Ruch O., 2006).

7.2. El DHA y NS1643 afectan el potencial de membrana en reposo de las células HEK-Kv10.1.

La adición de DHA y NS1643 provoca la activación de canales Kv10.1 lo que permite que más iones de K⁺ fluyan a favor de su gradiente electroquímico, es decir, los iones pasan del interior de la célula hacia el exterior, lo que propicia un potencial de membrana de reposo más negativo. Los iones de potasio al tener carga positiva y al salir de la célula producen que el potencial de membrana en el interior de la célula sea menos positivo. Esto es de hecho lo que ocurre al medir el PRM en presencia de los compuestos. El DHA produce una hiperpolarización del PRM durante el tiempo que éste está bañando a las células y genera un cambio de voltaje de aproximadamente -10 mV. Por su parte el NS1643, al igual que en los registros de corrientes, éste producía un efecto bifásico sobre el potencial: primero causa una hiperpolarización transitoria (de mayor magnitud que el DHA), para después producir una depolarización lenta y que se mantuvo aún cuando el NS1643 fue retirado del baño de registro. Los efectos observados del NS1643 sobre el potencial de membrana son congruentes con los observados a nivel de corrientes, observando una hiperpolarización cuando el canal se abre y una depolarización cuando el canal es inhibido.

La diferencia de los efectos entre el DHA y del NS1643 sobre el Kv10.1 pueden asociarse con que los compuestos tengan un sitio de unión y mecanismos de acción diferentes sobre el canal: el DHA, puede que actúe en Kv10.1 como se ha descrito para otros canales, donde a partir de un mecanismo electrostático produzca la activación del canal, mientras que el NS1643, probablemente tenga un sitio o varios sitios diferentes de unión lo que propicia un efecto dual, como se ha observado en otros canales.

El hecho de que los compuestos agonistas del Kv10.1 ensayados en este trabajo hayan hiperpolarizado la membrana indica que inhibir estos canales de potasio tendría un efecto contrario, es decir: depolarización de la membrana. Cambios en el potencial de membrana puede influir drásticamente en procesos como la proliferación celular, de alta relevancia en la formación de tumores en la patología del cáncer.

7.3. Ensayo de viabilidad: los compuestos no causan disminución de viabilidad celular.

Como parte de la caracterización de los compuestos moduladores del canal Kv10.1 se consideró analizar la viabilidad celular de las CHO-Kv10.1 cuando están en presencia de estos compuestos. Los resultados indican que los compuestos no disminuyen la viabilidad celular de las CHO-Kv10.1 y de este modo, la potenciación de la magnitud de la corriente iónica que ocurre a través de los canales debido a los compuestos, no afecta la capacidad de las células para continuar con los procesos metabólicos que permiten a las células continuar con vida. Asimismo se muestra que procesos independientes al canal iónico Kv10.1 tampoco interfieren en la viabilidad celular, ya que hay posibilidad de que los compuestos afecten a la célula a través de otros mecanismos, como por ejemplo lo que causa el astemizol en células MCF-7 investigado por Jakhar y colaboradores en el 2015. En esa investigación se evaluó el efecto citotóxico del astemizol (6 μ M) a través del ensayo de LDH, este ensayo mide la cantidad de la lactato deshidrogenasa (LDH) el cual es rápidamente liberada al medio extracelular cuando hay daño en la membrana celular. Las MCF-7 mostraron

liberación de LDH en cerca del 55% de las células cuando en el control sólo ocurrió en menos del 10%. Además, se observó que en esta mismas células el astemizol, incubado por 12 horas, produjo un incremento en especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) en más de 130 veces con respecto al control. El astemizol lo que causa es un aumento del calcio intracelular, y el calcio acumulado en la mitocondria genera estrés a través de la producción de ROS; los altos niveles de calcio estimulan a la cadena respiratoria para producir ROS resultando en liberación de factores proapoptóticos. Como resultado final se desencadenó el proceso de autofagia en el que cerca del 20% de las células resultaron autofágicas (Jakhar R. *et al.*, 2015).

Analizar cambios en la viabilidad celular debido a los tratamientos con las moléculas de interés es indispensable si se quiere proponer a éstos en futuros experimentos. A pesar de que los compuestos no afectaron la viabilidad de las células con expresión del Kv10.1, todavía pueden existir otros procesos celulares que puedan ser afectadas por éstos.

También se evaluaron los compuestos sobre la viabilidad de células CHO-WT y se observó que tampoco afectaron su viabilidad celular. Este resultado es muy importante ya que conduce a pensar que el compuesto no tendría la capacidad de afectar la viabilidad de células sanas que como las CHO-WT no expresan el Kv10.1.

El DHA que es un diterpenoide se encuentra en resinas de varias especies de pinos y se ha investigado su efecto sobre viabilidad celular, como la realizada por Kim y colaboradores en el que ensayaron la viabilidad de seis líneas celulares de cáncer gástrico (AGS, MKN-28, YCC-2, SNU-216 y SNU-668) en presencia del DHA y observaron que la viabilidad celular es dosis dependiente; ellos ensayaron concentraciones desde 20 hasta 160 μM y a la mínima concentración no hubo un cambios en la viabilidad, que es lo que nosotros observamos a 10 μM (Kim, W. *et al.*, 2021). Luo y colaboradores observaron que un derivado del DHA, el QC4, que también es capaz de inducir muerte celular vía apoptosis y muerte celular isquémica en células de cáncer gástrico SGC-7901 y MGCC80-3; el compuesto produjo muerte inducida en presencia de 5, 7.5, 10, 12.5 y 15 $\mu\text{g/ml}$ de QC4 a

través de disminuir el ATP y de daño mitocondrial (Luo D. *et al.*, 2016). En este mismo artículo Luo y colaboradores resaltan el hecho de que el DHA es un molde perfecto para realizar modificaciones estructurales y que muchos derivados del DHA se ha reportado que inhiben células cancerosas. Estos y otras investigaciones demuestran el potencial que el DHA tiene para afectar la viabilidad celular, y aunque en este trabajo no se observó cambios en la viabilidad celular compuestos similares o derivados de él podrían ser evaluados sobre viabilidad celular de células que expresen o sobreexpresen el Kv10.1.

Lansu y Gentile en 2013 evaluaron el efecto del NS1643 sobre las células CHO y SKBr3 que expresaban hERG1 (Kv11.1), al igual que nosotros ellos no encontraron diferencias entre las células tratadas y no tratadas con NS1643; las concentraciones usadas por ellos fueron 10 y 50 μM .

7.4. Ensayo de migración: las moléculas no afectan la migración de células CHO-Kv10.1.

Con los ensayos de migración y como lo refleja la **Fig. 18** de la tesis, se puede observar que las células CHO-WT tienden a migrar más lento que las células CHO-Kv10.1, lo que indica que la expresión del canal sí parece conferir cierta ventaja a estas células al momento de intentar cerrar el espacio dejado por los insertos celulares, al menos en lo observado a las 24 h. Estas diferencias se vuelven más claras al momento de incrementar el porcentaje de SFB disponible en el medio de cultivo. Debido a que las células fueron tratadas previamente con mitomicina C, se puede descartar que el cierre de la herida se deba a un efecto de la proliferación celular. Además, en todos los tratamientos realizados en las CHO-WT el área de la herida a las 24 horas era de alrededor del 70% respecto del área original (100%). Estos resultados contrastan con el comportamiento observado por los tratamientos en las CHO-Kv10.1, en donde se observa una variación mayor en el área que queda por cerrar a las 24 h, no obstante, con la prueba estadística utilizada no se encontró una diferencia estadísticamente significativa cuando se compararan contra la situación control (SFB 10%). Igual, en las CHO-Kv10.1, al comparar los tratamientos en presencia de los compuestos NS1643, DHA y

astemizol con respecto al tratamiento con SFB 10%, todos están cerca del 40% respecto del área original (100%), y sólo el NS1643 tiene un porcentaje menor que es de 20%, y aunque visualmente parece aumentar la migración celular este cambio no fue estadísticamente significativo. Debido a que el DHA, que causa una hiperpolarización del voltaje transmembrana, pareciera no estar implicado en un posible aumento de la migración celular, el hipotético incremento de este proceso en presencia del NS1643 no es causado por la capacidad de este de hiperpolarizar la membrana. La depolarización del voltaje transmembranal disminuye el potencial electroquímico del flujo de Ca^{2+} hacia el interior de la célula. El aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ permite el rompimiento de las adhesiones focales, las cuales son complejos proteínicos que contienen integrinas, lo que permite que la célula se desprenda de la matriz extracelular y permita el movimiento de la célula hacia la dirección de migración (Schwab A. *et al.*, 2012). Con respecto al efecto inhibitorio que el NS1643 tiene sobre el canal, causando una depolarización del potencial de membrana, se ha observado que de hecho en células cancerosas que sobreexpresan el canal Kv10.1 el bloqueo de este canal causa una disminución en la migración celular no un aumento (Agarwal J. R. *et al.*, 2010). Esto sugiere que el cambio de potencial de membrana producido por el NS1643 podría no ser el mecanismo que media la migración celular. Además, se ha visto que la adición de NS1643 a células que sobreexpresan el canal Kv11.1 (hERG), células HT29, FET y SW480, el compuesto causa una disminución en la migración con respecto al control (Eskandari N. *et al.*, 2021). Así que el resultado estadísticamente no significativo del NS1643 es congruente con la literatura.

Hasta el momento se ha propuesto que los mecanismos por los que los canales iónicos interceden en el proceso de migración ocurren indirectamente a través de la regulación del potencial transmembranal, de la concentración de Ca^{2+} , del volumen celular y del pH intracelular y extracelular (Schwab A. *et al.*, 2012).

Cuando un canal iónico permite el flujo saliente de iones potasio, el potencial de membrana tiende a hiperpolarizarse lo cual aumenta el gradiente electroquímico para el flujo de calcio al interior de la célula; esto ocurre porque como la concentración del calcio en el medio extracelular es de alrededor de 2 mM y la

concentración intracelular está en el orden de nanomolar el potencial de reversión del calcio es mayor a +100 mV por lo cual entre más hiperpolarizada esté la membrana mayor flujo entrante de calcio puede ocurrir. Existen estudios como el llevado a cabo por Agarwal y colaboradores en el 2010, en los que en vez de activadores se usaron inhibidores del canal Kv10.1 (imipramina y mAb56), encontrando que en células HEL (eritroleucemia) la migración se reduce en hasta un 65% (Agarwal J.R. *et al.*, 2010). El bloqueo del canal en este caso pudo haber generado una depolarización de la membrana lo cual es contrario a lo que nosotros pretendemos realizar. El que el cambio en la tasa de migración no haya sido estadísticamente significativo en presencia del NS1643 y el DHA podría indicar que la hiperpolarización por sí sola, y aumentando el calcio intracelular como consecuencia, no es suficiente para alterar el proceso, ya que la migración es un proceso que implica muchas proteínas y vías. El resultado igualmente indica que no cualquier cambio en el potencial eléctrico transmembranal relacionado con el Kv10.1 afecta la migración. Sería importante realizar experimentos en el que se monitoree el potencial de membrana de la células a través del tiempo, ya que podría ocurrir que la corriente incrementada o algún efecto causado por ésta pueda ser contrarrestada por procesos homeostáticos celulares. De esta forma se podría tener mayor confianza en que realmente el potencial de membrana está hiperpolarizado con respecto a la situación control.

7.5. Ensayo de proliferación.

El ensayo de MTT mide indirectamente la proliferación celular que ocurre a través de un cierto periodo de tiempo, al cuantificar la cantidad de formazán diluido procedente de cristales de este compuesto formados por las enzimas oxidorreductasas que se encuentran en el interior de las células, así entre mayor número de cristales de formazán formados mayor número de oxidorreductasa y mayor número de células vivas presentes. En este experimento se utilizaron como tratamientos un compuesto inhibidor del canal Kv10.1 (astemizol), un compuesto activador (DHA) y un compuesto con efecto dual, es decir, que activa e inhibe la corriente del canal (NS1643). El tratamiento con astemizol reflejó una tasa de

proliferación disminuida en las CHO-Kv10.1; estos resultados se relacionan con el hecho de que varios compuestos inhibitorios del canal Kv10.1 han resultado que son capaces de disminuir la tasa de proliferación celular (García-Quiroz J. & Camacho J., 2011; Na W. *et al.*, 2020).

En el caso del DHA que potenció la corriente del canal, se observa una tendencia a aumentar la tasa de proliferación, pero la diferencia no es estadísticamente significativa con respecto a la situación control. El ácido araquidónico que es un PUFA y que modula canales iónicos de forma similar a como lo hace el DHA se ha mostrado que es capaz de potenciar la corriente del Kv10.1, de desplazar la curva de activación dependiente de voltaje del canal hacia la izquierda y de incrementar la proliferación y la actividad metabólica de las células de melanoma cuando las células fueron expuestas a concentraciones de 5 μ M (Gavrilova-Ruch O., 2006). Estos resultados y la tendencia que parecería haber con el DHA sobre la proliferación podría motivar a realizar otras investigación con este compuesto sobre este proceso.

El NS1643, como se vio, causó un efecto bifásico sobre la corriente del canal Kv10.1, es decir, la potenció y la inhibió; esta efecto dual podría permitir que el compuesto no disminuya la tasa de proliferación de las células que si sólo tuviera un efecto inhibitorio. El NS1643 se ha observado que inhibe el crecimiento de células tumorales de mama, las cuales sobreexpresan el canal Kv11.1 (Lansu K. & Gentile S., 2013). Las células tumorales en cultivo expuestas a NS1643 muestran niveles reducidos de marcadores de proliferación, altos niveles de expresión de marcadores de senescencia e incremento de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) y daño en el DNA comparado con tumores de ratones no tratados; el compuesto detiene del ciclo celular (Fukushiro-Lopes D: F. *et al.*, 2017). El compuesto también es activador del canal Kv11.3 (ERG3 o KCNH7) y se ha encontrado que el compuesto produce una inhibición fuerte de la proliferación celular en células de melanoma a través de la activación de un programa de senescencia celular (Perez-Neut *et al.*, 2016).

No puede discutirse acerca de una posible intervención del potencial de membrana en el cambio de tasa de proliferación debido a que ninguno de los

potenciadores del canal resultó en un cambio de proliferación con significancia estadística con respecto al control.

El canal Kv10.1 ha sido principalmente descrito como un promotor del ciclo celular y como consecuencia de la proliferación celular. En investigaciones como las de Sánchez y colaboradores realizadas en líneas celulares no neuronales, como TERT-RPE1 (células del epitelio retinal), se observó que el canal es expresado en la fase G2/M, donde es necesario para un tránsito temporal normal y cuando el canal no es expresado las células tardan más tiempo en la fase G2/M (Sánchez A. *et al.*, 2016).

7.6 ¿El canal Kv10.1 puede ejercer sus efectos sin necesidad de conducir iones?

En células cancerosas, en donde el canal Kv10.1 está sobreexpresado, el canal las provee con una tasa mayor de proliferación. Los mecanismos por los cuales el canal induce este aumento pueden ser tanto dependientes como independientes de la conductancia del canal ya que cuando se han expresado canales que no tienen capacidad de conducir iones la proliferación celular disminuye, pero no lo suficiente como para afirmar que en la migración celular no intervienen procesos independientes de la conductancia. Por ejemplo, en el 2005 Hegle y colaboradores transfectaron NIH 3T3 con canales Kv10.1 que presentaban una mutación puntual que les impedían conducir iones (EAG-F456A) y observaron que las células proliferaban igual a las células con canales Kv10.1 normales, indicando que no se necesitaba un flujo de iones de K⁺ para incrementar la proliferación celular. También diseñaron 2 canales que presentaban ganancia de función (EAG-TATSAA y EAG-HTEE), lo cual les permitía desplazar su V_{1/2} de activación hacia valores más negativos y por tanto desplazaban el potencial de membrana en reposo hacia potenciales más negativos. Células que expresaban canales EAG-TATSAA/F456A o EAG-HTEE/F456A disminuían su tasa de proliferación respecto al canal Kv10.1 normal; lo que esta mezcla de mutaciones causaba era que había más canales abiertos (debido al V_{1/2} de activación más negativo) al voltaje de

membrana en reposo y debido a que los canales no tenían la capacidad de conducir iones el potencial de reposo no podía cambiar y por lo tanto el canal permanecía en estado abierto. A partir de estos resultados, pareciera que la proliferación está ligada a la posición del dominio sensor de voltaje. En esta investigación ellos observaron que la proliferación inducida por medio del canal EAG-F456A utiliza la vía de señalización de la p38 MAP cinasa (Hegle A. P. *et al.*, 2005).

Otra investigación que reafirma que el canal Kv10.1 induce proliferación de manera independiente a conductancia fue la llevada a cabo por Downie y colaboradores que en el 2008, propusieron que la expresión del canal Kv10.1 produce una mayor proliferación celular cancerosa al promover un incremento de la angiogénesis a través de la producción de una hipoxia leve; la sobreexpresión del canal induce un incremento de HIF-1 α , el cual es un factor de transcripción inducible por hipoxia, lo que provoca un incremento de VEGF el cual es uno de los factores que influyen la angiogénesis. Para conocer si el incremento de la proliferación celular era dependiente de la conductancia del canal, usaron un canal el cual tenía una glicina sustituida por una serina en la secuencia de la región del poro y de esta forma abolir la permeación; este canal mutado fue transfectado en células NIH 3T3 y las células implantadas en un ratón. Las células fueron capaces de producir tumores, aunque de menor masa que los producidos por el canal Kv10.1 normal. Ésta y otras observaciones indicaron que el canal promueve la proliferación celular de forma independiente a la conductancia iónica (Downie B. R. *et al.*, 2018).

Lo que se intenta en esta tesis es usar al canal por su capacidad conductora y poder hiperpolarizar el potencial de membrana para intentar disminuir procesos celulares (migración y proliferación celular) ya que las células cancerosas tienden a tener un potencial más depolarizado. Basados en nuestros resultados pareciera que el hecho de hiperpolarizar la membrana activando el canal no interfiere en la proliferación y migración celular. Los compuestos modularon al canal en los experimentos de electrofisiología, pero el tiempo que las células estuvieron en

contacto con los compuestos fue muy poco comparado con el tiempo que los compuestos fueron evaluados en los ensayos funcionales que fue de hasta 24 horas. La célula puede a partir de procesos de homeostasis o de desensibilización provocar que el compuesto no tenga el efecto observado a lo largo de todo el tiempo evaluado. Ya que el cambio de voltaje es un reflejo de la modulación del canal es importante evaluar este parámetro cada cierto tiempo y tener certeza de si el efecto está presente en todo el lapso de duración.

7.7 Perspectivas de trabajo.

1. Realizar estudios de *patch clamp* en la modalidad de *inside-out* para conocer si los compuestos moduladores del canal Kv10.1 pueden potenciar la corriente producidas por este canal al ser agregados del lado intracelular.
2. Realizar experimentos con canales Kv10.1 que no tengan la capacidad para conducir iones para conocer si los compuestos promueven algún proceso celular independiente de la conductancia del canal.
3. Evaluar el potencial de membrana en células HEK-Kv10.1 durante intervalos largos de tiempo en presencia de las moléculas ensayadas, para intentar asociar los cambios del PMR con los ensayos funcionales.
4. Evaluar los compuestos ensayados en líneas celulares con expresión endógena del canal Kv10.1.

8. Conclusiones.

1. La corriente iónica que se registró en la línea celular HEK-Kv10.1, presentan las características biofísicas del canal Kv10.1.
2. El NS1643 y el DHA producen un incremento de las corrientes generadas por el canal Kv10.1 expresado de forma estable en células HEK293. El NS1643 produce un efecto bifásico el cual es dependiente del tiempo de aplicación, generando un efecto positivo en los primeros segundos de aplicación y después un efecto inhibitorio (irreversible) en la corriente. Tanto los efectos producidos por el NS1643 como del DHA son dependientes de la concentración.
3. El NS1643 y el DHA producen hiperpolarización del PMR de las células con expresión del canal Kv10.1, dicha hiperpolarización fue de alrededor de 10 mV.
4. La incubación de NS1643 y el DHA durante 24 h no afecta la viabilidad celular de la CHO-WT ni CHO-Kv10.
5. En los ensayos del cierre de la herida, las moléculas no produjeron cambios en la migración celular pasadas las 24 horas.
6. NS1643 y DHA no afectan la tasa de proliferación celular en las líneas celulares utilizadas.

Bibliografia

Abdul Kadir, L., Stacey, M., & Barrett-Jolley, R. (2018). Emerging roles of the membrane potential: action beyond the action potential. *Frontiers in physiology*, 1661.

<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01661>

Adams, D. J., Alewood, P. F., Craik, D. J., Drinkwater, R. D., & Lewis, R. J. (1999). Conotoxins and their potential pharmaceutical applications. *Drug development research*, 46(3-4), 219-234.

[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2299\(199903/04\)46:3/4<219::AID-DDR7>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2299(199903/04)46:3/4<219::AID-DDR7>3.0.CO;2-S)

Agarwal, J. R., Griesinger, F., Stühmer, W., & Pardo, L. A. (2010). The potassium channel Ether a go-go is a novel prognostic factor with functional relevance in acute myeloid leukemia. *Molecular cancer*, 9(1), 1-16.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter P. (2015). *Molecular Biology of The Cell*. 6^o Edition, Garland Science.

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), 1-8.

<https://doi.org/10.1186/1746-1596-5-78>

Badaoui, M., Mimsy-Julienne C., Saby, C., Van Gulick, L., Peretti, M., Jeannesson, P., Morjani, H., Ouadid-Ahidouch, H. (2018). Collagen type 1 promotes survival of human breast cancer cells by overexpressing Kv10. 1 potassium and Orai1 calcium channels through DDR1-dependent pathway. *Oncotarget*, 9(37), 24653.

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.19065>

Bagal, S. K., Brown, A. D., Cox, P. J., Omoto, K., Owen, R. M., Pryde, D. C., Sidders, B., Skerratt, S. E., Stevens, E. B., Storer, R. I., Swain, N. A. (2013). Ion channels as therapeutic targets: a drug discovery perspective. *Journal of medicinal chemistry*, 56(3), 593-624.

<https://doi.org/10.1021/jm3011433>

Barrese, V., Miceli, F., Soldovieri, M. V., Ambrosino, P., Iannotti, F. A., Cilio, M. R., & Tagliatela, M. (2010). Neuronal potassium channel openers in the management of epilepsy: role and potential of retigabine. *Clinical pharmacology: advances and applications*, 2, 225.

<https://doi.org/10.2147/cpaa.s15369>

Barros, F., de la Peña, P., Domínguez, P., Sierra, L. M., & Pardo, L. A. (2020). The EAG voltage-dependent K⁺ channel subfamily: similarities and differences in structural organization and gating. *Frontiers in pharmacology*, 11, 411.

<https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00411>

Bauer, C. K., & Schwarz, J. R. (2001). Physiology of EAG K⁺ channels. *The Journal of membrane biology*, 182(1), 1-15.

<https://doi.org/10.1007/s00232-001-0031-3>

Bernal-Ramos, G., Hernández-Gallegos, E., Vera, E., Chávez-López, M. G., Zúñiga-García, V., Sánchez-Pérez, Y., Garrido, E., Camacho, J. (2017). Astemizole inhibits cell proliferation in human prostate tumorigenic cells expressing ether í-go-go-1 potassium channels. *Cellular and Molecular Biology*, 63(12), 11-13.

<https://doi.org/10.14715/cmb/2017.63.12.4>

Bialer, M., Johannessen, S. I., Koeppe, M. J., Levy, R. H., Perucca, E., Tomson, T., & White, H. S. (2018). Progress report on new antiepileptic drugs: A summary of the Fourteenth Eilat Conference on New Antiepileptic Drugs and Devices (EILAT

XIV). I. Drugs in preclinical and early clinical development. *Epilepsia*, 59(10), 1811-1841.

Bilet, A., & Bauer, C. K. (2012). Effects of the small molecule HERG activator NS1643 on Kv11. 3 channels. *PLoS One*, 7(11), e50886.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050886>

Binggeli, R., & Weinstein, R. C. (1986). Membrane potentials and sodium channels: hypotheses for growth regulation and cancer formation based on changes in sodium channels and gap junctions. *Journal of theoretical biology*, 123(4), 377-401.
[https://doi.org/10.1016/s0022-5193\(86\)80209-0](https://doi.org/10.1016/s0022-5193(86)80209-0)

Brackenbury, W. J. (2016). Ion channels in cancer. In *Ion channels in health and disease* (pp. 131-163). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802002-9.00006-6>

Brüggemann, A., Pardo, L. A., Stühmer, W., & Pongs, O. (1993). Ether-a-go-go encodes a voltage-gated channel permeable to K⁺ and Ca²⁺ and modulated by cAMP. *Nature*, 365(6445), 445-448.
<https://doi.org/10.1038/365445a0>

Brüggemann, A., Stühmer, W., & Pardo, L. A. (1997). Mitosis-promoting factor-mediated suppression of a cloned delayed rectifier potassium channel expressed in *Xenopus* oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(2), 537-542.
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.2.537>

Byrne, J., Heidelberger, R., & Waxham M., (2014). From Molecules to Networks. 3^o Edition, Academic Press, Elsevier.

Camacho, J. (2006). Ether a go-go potassium channels and cancer. *Cancer letters*, 233(1), 1-9.

doi: 10.1016/j.canlet.2005.02.016.

Casis, O., Olesen, S. P., & Sanguinetti, M. C. (2006). Mechanism of action of NS1643, a novel hERG channel activator. *Molecular Pharmacology*.

<https://doi.org/10.1124/mol.105.019943>

Chhabra, M. (2021). Biological therapeutic modalities. In *Translational Biotechnology* (pp. 137-164). Academic Press.

Chen J., Xuan Z., Song W., Han W., Chen H., Du Y., Xie H., Zhao Y., Zheng S., Song P. (2021). EAG1 enhances hepatocellular carcinoma proliferation by modulating SKP2 and metastasis through pseudopod formation. *Oncogene*, 40(1), 163-176.

<https://doi.org/10.1038/s41388-020-01522-6>

Chowdhury, S., & Chanda, B. (2013). Free-energy relationships in ion channels activated by voltage and ligand. *Journal of General Physiology*, 141(1), 11-28.

<https://doi.org/10.1085/jgp.201210860>

Clare, J. J. (2010). Targeting ion channels for drug discovery. *Discovery medicine*, 9(46), 253-260.

Cole, K. S., & Moore, J. W. (1960). Potassium ion current in the squid giant axon: dynamic characteristic. *Biophysical Journal*, 1(1), 1-14.

[https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(60\)86871-3](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(60)86871-3)

Cone Jr, C. D. (1969). Section of biological and medical sciences: electroosmotic interactions accompanying mitosis initiation in sarcoma cells in vitro. *Transactions*

of the New York Academy of Sciences, 31(4 Series II), 404-427.

<https://doi.org/10.1111/j.2164-0947.1969.tb02926.x>

Cone Jr, C. D., & Tongier Jr, M. (1971). Control of somatic cell mitosis by simulated changes in the transmembrane potential level. *Oncology*, 25(2), 168-182.

<https://doi.org/10.1159/000224567>

Cone Jr, C. D. (1974). The role of the surface electrical transmembrane potential in normal and malignant mitogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 238(1), 420-435.

<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1974.tb26808.x>

Ding, X. W., Luo, H. S., Jin, X., Yan, J. J., & Ai, Y. W. (2007). Aberrant expression of Eag1 potassium channels in gastric cancer patients and cell lines. *Medical oncology*, 24(3), 345-350.

Doyle, D. A., Cabral, J. M., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait B. T. & MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, 280(5360), 69-77.

Downie, B. R., Sánchez, A., Knötgen, H., Contreras-Jurado, C., Gymnopoulos, M., Weber, C., Stühmer W. & Pardo, L. A. (2008). Eag1 expression interferes with hypoxia homeostasis and induces angiogenesis in tumors. *Journal of Biological Chemistry*, 283(52), 36234-36240.

<https://doi.org/10.1074/jbc.m801830200>

Elmedyby, P., Olesen, S. P., & Grunnet, M. (2007). Activation of ERG2 potassium channels by the diphenylurea NS1643. *Neuropharmacology*, 53(2), 283-294.

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.05.009>

Eskandari, N., Senyuk, V., Moore, J., Kalik, Z., Luan, Q., Papautsky, I., Moshiri, A., Bocchetta, M., Salami, S. A., Oryan, S., Gentile, S. (2021). Molecular Activation of the Kv11. 1 Channel Reprograms EMT in Colon Cancer by Inhibiting TGF β Signaling via Activation of Calcineurin. *Cancers*, 13(23), 6025.
<https://doi.org/10.3390/cancers13236025>

Fukushiro-Lopes, D. F., Hegel, A. D., Rao, V., Wyatt, D., Baker, A., Breuer, E. K., Osipo, C., Zartman, J. J., Burnette, M., Kaja, S., Kouzoukas, D., Burris, S., Jones W. K., Gentile, S. (2018). Preclinical study of a Kv11. 1 potassium channel activator as antineoplastic approach for breast cancer. *Oncotarget*, 9(3), 3321.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.22925>

García-Ferreiro, R. E., Kerschensteiner, D., Major, F., Monje, F., Stühmer, W., & Pardo, L. A. (2004). Mechanism of block of hEag1 K⁺ channels by imipramine and astemizole. *The Journal of General Physiology*, 124(4), 301–317.
<https://doi.org/10.1085/jgp.200409041>

García-Quiroz, J., & Camacho, J. (2011). Astemizole: an old anti-histamine as a new promising anti-cancer drug. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 11(3), 307-314.
DOI: 10.2174/187152011795347513

Gavrilova-Ruch, O., Schönherr, R., & Heinemann, S. H. (2007). Activation of hEAG1 potassium channels by arachidonic acid. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 453(6), 891-903.
<https://doi.org/10.1007/s00424-006-0173-3>

Gavrilova-Ruch, O., Schonherr, K., Gessner, G., Schonherr, R., Klapperstuck, T., Wohlrab, W., Heinemann, S. H. (2002). Effects of imipramine on ion channels and proliferation of IGR1 melanoma cells. *J Membr Biol*, 188, 137-149.
<https://doi.org/10.1007/s00232-001-0181-3>

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.

<https://doi.org/10.1002/jcp.25448>

Gómez-Varela, D., Zwick-Wallasch, E., Knötgen, H., Sánchez, A., Hettmann, T., Ossipov, D., Weseloh, R., Contreras-Jurado, C., Rothe, M., Stühmer, W., Pardo, L. A. (2007). Monoclonal antibody blockade of the human Eag1 potassium channel function exerts antitumor activity. *Cancer Research*, 67(15), 7343-7349.

<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0107>

González, C., Baez-Nieto, D., Valencia, I., Oyarzún, I., Rojas, P., Naranjo, D., & Latorre, R. (2012). K⁺ channels: function-structural overview. *Comprehensive physiology*, 2(3), 2087-2149.

<https://doi.org/10.1002/cphy.c110047>

Guo, J., Cheng, Y. M., Lees-Miller, J. P., Perissinotti, L. L., Claydon, T. W., Hull, C. M., Thouta, S., Roach D. E., Durdagi, S., Noskov, S. Y., Duff, H. J. (2015). NS1643 interacts around L529 of hERG to alter voltage sensor movement on the path to activation. *Biophysical journal*, 108(6), 1400-1413.

<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.12.055>.

Gunthorpe, M. J., Large, C. H., & Sankar, R. (2012). The mechanism of action of retigabine (ezogabine), a first-in-class K⁺ channel opener for the treatment of epilepsy. *Epilepsia*, 53(3), 412-424.

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.

<https://doi.org/10.1155/2017/7371010>

Hemmerlein, B., Weseloh, R. M., Mello de Queiroz, F., Knötgen, H., Sánchez, A., Rubio, M. E., Martin, S., Schliephacke, T., Jenke, M., Heinz-Joachim-Radzun., Stühmer, W., Pardo, L. A. (2006). Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours. *Molecular cancer*, 5, 41. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-5-41>

Hille, B. (2001). Ion Channel Excitable Membranes. 3^o Edition, *Sunderland. Massachusetts USA*.

Huang, X., & Jan, L. Y. (2014). Targeting potassium channels in cancer. *Journal of Cell Biology*, 206(2), 151-162.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201404136>

Jakhar, R., Paul, S., Bhardwaj, M., & Kang, S. C. (2016). Astemizole–Histamine induces Beclin-1-independent autophagy by targeting p53-dependent crosstalk between autophagy and apoptosis. *Cancer letters*, 372(1), 89-100.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.12.024>

Kaplan, W. D., & Trout III, W. E. (1969). The behavior of four neurological mutants of *Drosophila*. *Genetics*, 61(2), 399.
<https://doi.org/10.1093/genetics/61.2.399>

Kapetanovic, I. M., & Rundfeldt, C. (1996). D-23129: A New Anticonvulsant Compound. *CNS Drug Reviews*, 2(3), 308-321.

Kim, W. J., Kim, W., Bae, J. M., Gim, J., & Kim, S. J. (2021). Dehydroabiatic Acid Is a Novel Survivin Inhibitor for Gastric Cancer. *Plants*, 10(6), 1047.
<https://doi.org/10.3390/plants10061047>

Kortüm, F., Caputo, V., Bauer, C. K., Stella, L., Ciolfi, A., Alawi, M., Bocchinfuso, G., Flex, E., Paolacci, S., Dentici, M. L., Grammatico, P., Korenke, G. C., Leuzzi, V., Mowat, D., Nair, L. D., Nguyen, T. T., Thierry, P., White, S. M., Dallapiccola, B., Pizzuti, A., Campeau, P. M., Tartaglia, M., Kutsche, K. (2015). Mutations in KCNH1 and ATP6V1B2 cause Zimmermann-Laband syndrome. *Nature genetics*, 47(6), 661-667.
<https://doi.org/10.1038/ng.3282>

Lansu, K., & Gentile, S. (2013). Potassium channel activation inhibits proliferation of breast cancer cells by activating a senescence program. *Cell death & disease*, 4(6), e652-e652.
<https://doi.org/10.1038/cddis.2013.174>

Lastraioli, E., Iorio, J., & Arcangeli, A. (2015). Ion channel expression as promising cancer biomarker. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1848(10), 2685-2702.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.12.016>

Lawson, K. (2000). Potassium channel openers as potential therapeutic weapons in ion channel disease. *Kidney international*, 57(3), 838-845.
<https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00923.x>

Luo, D., Ni, Q., Ji, A., Gu, W., Wu, J., & Jiang, C. (2016). Dehydroabietic acid derivative QC4 induces gastric cancer cell death via oncosis and apoptosis. *BioMed Research International*, 2016.
<https://doi.org/10.1155/2016/2581061>

Ma, L., Chin, Y. K. Y., Dekan, Z., Herzig, V., Chow, C. Y., Heighway, J., Lam, S. W., Guillemin, G. J., Alewood, P. F., King, G. F. (2018). Novel venom-derived inhibitors of the human EAG channel, a putative antiepileptic drug

target. *Biochemical Pharmacology*, 158, 60-72.

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.08.038>

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>

Moreels, L., Peigneur, S., Galan, D. T., De Pauw, E., Béress, L., Waelkens, E., Pardo L. A., Quinton L. & Tytgat, J. (2017). APETx4, a novel sea anemone toxin and a modulator of the cancer-relevant potassium channel KV10.1. *Marine drugs*, 15(9), 287. <https://doi.org/10.3390/md15090287>

Moreels, L., Peigneur, S., Yamaguchi, Y., Vriens, K., Waelkens, E., Zhu, S., Thevissen, K., Cammue, B. P. A., Sato, K., Tytgat, J. (2017). Expanding the pharmacological profile of κ-hefutoxin 1 and analogues: A focus on the inhibitory effect on the oncogenic channel Kv10.1. *Peptides*, 98, 43-50.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2016.08.008>

Mossmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4) –

Na, W., Ma, B., Shi, S., Chen, Y., Zhang, H., Zhan, Y., & An, H. (2020).

Procyanidin B1, a novel and specific inhibitor of Kv10.1 channel, suppresses the evolution of hepatoma. *Biochemical Pharmacology*, 178, 114089.

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114089>

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.

[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00973-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00973-9)

Ohwada, T., Nonomura, T., Maki, K., Sakamoto, K., Ohya, S., Muraki, K., & Imaizumi, Y. (2003). Dehydroabiatic acid derivatives as a novel scaffold for large-conductance calcium-activated K⁺ channel openers. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 13(22), 3971-3974.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2003.08.072>

Ottosson, N. E., Wu, X., Nolting, A., Karlsson, U., Lund, P. E., Ruda, K., Svensson, S., Konradsson, P. & Elinder, F. (2015). Resin-acid derivatives as potent electrostatic openers of voltage-gated K channels and suppressors of neuronal excitability. *Scientific reports*, 5(1), 1-12.
<https://doi.org/10.1038/srep13278>

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.
<https://doi.org/10.1007/s00424-015-1784-3>

Ousingsawat, J., Spitzner, M., Puntheeranurak, S., Terracciano, L., Tornillo, L., Bubendorf, L., Kunzelmann K. & 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. *The 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), 5540-5547.

<https://doi.org/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.

<https://doi.org/10.1038/nrc3635>

Perez-Neut, M., Haar, L., Rao, V., Santha, S., Lansu, K., Rana, B., Jones, W. K. & Gentile, S. (2016). Activation of hERG3 channel stimulates autophagy and promotes cellular senescence in melanoma. *Oncotarget*, 7(16), 21991.

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.7831>

Perissinotti, L. L., Guo, J., De Biase, P. M., Clancy, C. E., Duff, H. J., & Noskov, S. Y. (2015). Kinetic model for NS1643 drug activation of WT and L529I variants of Kv11. 1 (hERG1) potassium channel. *Biophysical journal*, 108(6), 1414-1424.

<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.12.056>

Perry, M., Sachse, F. B., Abbruzzese, J., & Sanguinetti, M. C. (2009). PD-118057 contacts the pore helix of hERG1 channels to attenuate inactivation and enhance K⁺ conductance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(47), 20075-20080.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0906597106>

Pollard, T. D., Earnshaw, W. C., Lippincott-Schwartz, J., & Johnson, G. T. (2017). 3^o Edition. *Cell biology*. Elsevier.

Prevarskaya, N., Skryma, R., & Shuba, Y. (2018). Ion channels in cancer: are cancer hallmarks oncochannelopathies?. *Physiological reviews*, 98(2), 559-621.

<https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2016>

Purves, D., Augustine, G. J., & Fitzpatrick, D. (2018). *Neuroscience*, 6^o Edition, Sinauer Associates.

Rettinger, J., Schwarz, S., & Schwarz, W. (2016). *Electrophysiology: Basics, modern approaches and applications*. Springer.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-30012-2>

Sánchez, A., Urrego, D., & Pardo, L. A. (2016). Cyclic expression of the voltage-gated potassium channel KV10. 1 promotes disassembly of the primary cilium. *EMBO reports*, 17(5), 708-723.
<https://doi.org/10.15252/embr.201541082>

Schewe, M., Sun, H., Mert, Ü., Mackenzie, A., Pike, A. C. W., Schulz, F., Constantin, C., Vowinkel, K. S., Conrad, L. J., Kiper, A. K., Gonzalez, W., Musinszki, M., Tegtmeier, M., Pryde, D. C., Belabed, H., Nazare, M., de Groot, B. L., Decher, N., Fakler, B., Carpenter, E. P., Tucker, S. J., Baukrowitz, T. (2019). A pharmacological master key mechanism that unlocks the selectivity filter gate in K⁺ channels. *Science*, 363(6429), 875-880.
<https://doi.org/10.1126/science.aav0569>

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7), 676-682.

Schwab, A., Fabian, A., Hanley, P. J., & Stock, C. (2012). Role of ion channels and transporters in cell migration. *Physiological reviews*.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2011>

Silverå Ejneby, M., Wu, X., Ottosson, N. E., Münger, E. P., Lundström, I., Konradsson, P., & Elinder, F. (2018). Atom-by-atom tuning of the electrostatic

potassium-channel modulator dehydroabiatic acid. *Journal of General Physiology*, 150(5), 731-750.

<https://doi.org/10.1085/jgp.201711965>

Stansfeld, C. E., Röper, J., Ludwig, J., Weseloh, R. M., Marsh, S. J., Brown, D. A., & Pongs, O. (1996). Elevation of intracellular calcium by muscarinic receptor activation induces a block of voltage-activated rat ether-a-go-go channels in a stably transfected cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(18), 9910-9914.

<https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9910>

Stühmer, W. (2017). El canal de potasio dependiente de voltaje Kv10. 1 y el cáncer. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 41(160), 274-280.

<https://doi.org/10.18257/raccefyn.509>

Ufartes, R., Schneider, T., Mortensen, L. S., de Juan Romero, C., Hentrich, K., Knoetgen, H., Beilinson, V., Moebius, W., Tarabykin, V., Alves, F., Pardo, L. A., Rawlins, J. N., Stuehmer, W. (2013). Behavioural and functional characterization of Kv10. 1 (Eag1) knockout mice. *Human molecular genetics*, 22(11), 2247-2262.

<https://doi.org/10.1093/hmg/ddt076>

Urrego, D., Tomczak, A. P., Zahed, F., Stühmer, W., & Pardo, L. A. (2014). Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1638), 20130094.

<https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0094>

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. *The Journal of Membrane Biology*, 250(2), 123-132.

<https://doi.org/10.1007/s00232-016-9944-8>

Wang, X., Chen, Y., Li, J., Guo, S., Lin, X., Zhang, H., Zhang, Y. & An, H. (2019). Tetrandrine, a novel inhibitor of ether-à-go-go-1 (Eag1), targeted to cervical cancer development. *Journal of Cellular Physiology*, 234(5), 7161-7173.

<https://doi.org/10.1002/jcp.27470>

Warmke, J. W., & Ganetzky, B. (1994). A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(8), 3438-3442.

<https://doi.org/10.1073/pnas.91.8.3438>

Whicher, J. R., & MacKinnon, R. (2016). Structure of the voltage-gated K⁺ channel Eag1 reveals an alternative voltage sensing mechanism. *Science*, 353(6300), 664-669.

<https://doi.org/10.1126/science.aaf8070>

Whicher, J. R., & MacKinnon, R. (2019). Regulation of Eag1 gating by its intracellular domains. *eLife*, 8, e49188.

<https://doi.org/10.7554/eLife.49188>

Wu, X., Chen, Z., Zeng, W., Zhong, Y., Liu, Q., & Wu, J. (2015). Silencing of eag1 gene inhibits osteosarcoma proliferation and migration by targeting STAT3-VEGF pathway. *BioMed Research International*, 2015.

<https://doi.org/10.1155/2015/617316>

Xu, X., Recanatini, M., Roberti, M., & Tseng, G. N. (2008). Probing the binding sites and mechanisms of action of two human ether-a-go-go-related gene channel activators, 1, 3-bis-(2-hydroxy-5-trifluoromethyl-phenyl)-urea (NS1643) and 2-[2-(3, 4-dichloro-phenyl)-2, 3-dihydro-1H-isoindol-5-ylamino]-nicotinic acid (PD307243). *Molecular pharmacology*, 73(6), 1709-1721.

<https://doi.org/10.1124/mol.108.045591>

Yang, Z., & Klionsky, D. J. (2010). Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nature cell biology*, 12(9), 814-822.

<https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00185>

Zhou, Y., Wong, C. O., Cho, K. J., van der Hoeven, D., Liang, H., Thakur, D. P., Luo, J., Babic, M., Zinsmaier, K. E., Zhu, M. X., Hu, H., Venkatachalam, K., Hancock, J. F. (2015). Membrane potential modulates plasma membrane phospholipid dynamics and K-Ras signaling. *Science*, 349(6250), 873-876.

<https://doi.org/10.1126/science.aaa5619>