



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“EFECTO MODULADOR DEL ANTIPSICÓTICO
PENFLURIDOL SOBRE EL CANAL ONCOGÉNICO DE
POTASIO Kv10.1”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGA

P R E S E N T A:

PAULINA LEÓN SÁNCHEZ

TUTOR:

Dr. ENOCH LUIS BALTAZAR



Ciudad Universitaria, CDMX, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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



Este trabajo fue realizado con el apoyo del proyecto financiado por CONACYT CB-2017/2018-A1-S-13646 y con beca con número de referencia 31246.

Hoja de datos del jurado

1.	Datos del alumno
Apellido paterno	León
Apellido materno	Sánchez
Nombre (s)	Paulina
Teléfono	55 25 60 15 28
Universidad	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad	Facultad de Ciencias
Carrera	Biología
Número de cuenta	316086945
2.	Datos del tutor
Grado	Dr.
Nombre(s)	Enoch
Apellido paterno	Luis
Apellido materno	Baltazar
3.	Datos del sinodal 1
Grado	Dr.
Nombre(s)	Juan Carlos
Apellido paterno	Gómora
Apellido materno	Martínez
4.	Datos del sinodal 2
Grado	Dr.
Nombre(s)	Ponciano
Apellido paterno	García
Apellido materno	Gutiérrez
5.	Datos del sinodal 3
Grado	Dr.
Nombre(s)	Victor
Apellido paterno	De la Rosa
Apellido materno	Jiménez
6.	Datos del sinodal 4
Grado	Dr.
Nombre(s)	Pedro David
Apellido paterno	Segura
Apellido materno	Chama
7.	Datos del trabajo escrito
Título	EFFECTO MODULADOR DEL ANTIPSICÓTICO PENFLURIDOL SOBRE EL CANAL ONCOGÉNICO DE POTASIO Kv10.1
Número de páginas	109
Año	2023

“Una ilusión, una sombra, una ficción, y el mayor bien es pequeño: que toda la vida es sueño, y los sueños, sueños son”

*La Vida es Sueño,
Pedro Calderón de la Barca.*

Agradecimientos Institucionales

Quisiera a agradecer al Laboratorio Nacional de Canalopatías por abrirme las puertas en un momento tan complicado como lo fue la pandemia y por permitirme descubrir mi potencial, en especial:

Al Dr. Enoch Luis Baltazar por confiar en mi trabajo y darme la invaluable oportunidad de tener mis primeras publicaciones, por sus grandes enseñanzas y por la dirección de esta tesis.

A la Dra. María Luisa Durán Pastén por su apoyo incondicional a lo largo del camino.

Al M.C. César Oliver Lara Figueroa por sus enseñanzas, guía, consejos y por hacer la vida en el lab más bonita.

A José Agustín Flores González por su calidez y apoyo dado durante la elaboración de este trabajo.

Al CONAHCYT por el apoyo que se me otorgó por el proyecto de Ciencia Básica 2017-2018-A1-S-13646 con clave 31246.

Agradecimientos personales

*A mis padres **Ma. Teresa Sánchez B.** y **Eduardo León H.** por darme la libertad y el apoyo para hacer lo que más me apasiona.*

*A mis hermanos, en especial a la **Lic. en comunicación y medios digitales Ma. Fernanda León Sánchez** que nunca dudó en recordarme que debía dormir y aprender a relajarme para rendir mejor.*

*A la **Biol. Jennifer Erzebet Olvera Martínez** porque además de ser una gran colega que me enseñó pacientemente algunas técnicas, se convirtió en una gran amiga que a la fecha me inspira a ser mejor persona.*

*Al **M.C. Esteban Gutiérrez García** por enseñarme, ser un guía, amigo y compañero de discusión de artículos curiosos.*

*Y porque estamos hechos de tantas personas, también quisiera agradecer a aquellas personas que estuvieron en mi camino y me ayudaron a seguir aún cuando parecía que el mundo se me caía, en especial a la **Biol. Vanessa Isabel Romero Estrada, Sharon Serrano, al QFB. Rodolfo Miranda Espino** y al **Dr. Iván Mijail Alquisiras Burgos**.*

Índice

1	Introducción.....	10
1.1	Perspectiva histórica de bioelectricidad y canales iónicos.....	10
1.2	Clasificación de canales iónicos.....	11
1.3	La superfamilia de canales iónicos de potasio.....	11
1.4	El canal Kv10.1, generalidades	11
1.4.1	Antecedentes históricos.....	12
1.4.2	Estructura, expresión y función	13
1.4.2.1	Estructura	
1.4.2.2	Expresión y función	
1.4.3	Biofísica	14
1.5	El rol de Kv10.1 en la progresión del cáncer	14
1.5.1	El cáncer y el potencial de membrana celular	14
1.5.2	Implicaciones del canal Kv10.1 en las Hallmarks del Cáncer	16
1.5.2.1	Proliferación y progresión del ciclo celular	
1.5.2.2	Migración y metástasis	
1.5.2.3	Angiogénesis	
1.6	El canal Kv10.1 como blanco terapéutico.....	19
1.6.1	Farmacología.....	19
1.6.2	Técnicas de screening.....	20
1.6.3	Nuestros screenings en el lab.....	21
1.7	El antipsicótico penfluridol.....	22
1.7.1	Propiedades antitumorales del penfluridol.....	23
2	Justificación	25
3	Hipótesis	26
4	Objetivos	26
4.1	Objetivos generales	26
4.2	Objetivos particulares.....	26
5	Materiales y métodos	27

5.1	Cultivo Celular.....	27
5.2	Experimentos de electrofisiología: <i>Patch Clamp</i>	27
5.3	Ensayos de Viabilidad	29
5.4	Ensayos de Migración	30
5.5	Moléculas	31
5.6	Análisis estadístico y procesamiento de imágenes.....	31
6	Resultados	32
6.1	Ensayos de electrofisiología: Patch-clamp	32
6.1.1	La cinética de las corrientes registradas en las células HEK-Kv10.1 se debe a la actividad del canal Kv10.1	32
6.1.2	El penfluridol inhibe las corrientes del canal Kv10.1.....	32
6.1.3	El efecto inhibitorio del PNFL no se recupera durante el lavado	35
6.1.4	Construcción de curva dosis-respuesta	36
6.2	Viabilidad: Marcaje con doble fluorescencia.....	36
6.2.1	El penfluridol no es citotóxico en HEK293-WT ni en HEK-Kv10.1 a 1 μ M	37
6.3	El Penfluridol modifica el cociente indicativo de la morfología celular en HEK-Kv10.1.	42
6.4	Migración: Ensayo de la herida	44
6.4.1	El Penfluridol reduce la tasa de migración asociada a la expresión del canal Kv10.1	
7	Discusión.....	49
8	Conclusiones	54
9	Referencias bibliográficas	56

Resumen

En los últimos años ha existido un creciente interés por encontrar nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento y diagnóstico del cáncer. Uno de los blancos potenciales es el canal de potasio activado por voltaje Kv10.1, el cual se encuentra sobreexpresado en alrededor del 70% de tipos de cáncer estudiados en clínica, mientras que su expresión normal se limita al sistema nervioso central. Aunado a esto, la inhibición de la actividad del canal ha mostrado resultados prometedores al detener el progreso de algunas de los *Hallmarks* del cáncer, sin embargo, varias de las moléculas propuestas como inhibidores son moléculas inespecíficas que pueden llegar a desencadenar otras alteraciones. Es por esta razón, que la búsqueda de nuevos moduladores del Kv10.1 continúa incesantemente.

Experimentos previos en el laboratorio mostraron que el penfluridol era capaz de modificar el potencial de membrana en reposo de células que expresaban el canal iónico Kv10.1, por lo que el objetivo de esta tesis se centró en identificar si dicha molécula era capaz de inhibir a dicho canal. El efecto inhibitorio se confirmó al hacer registros electrofisiológicos con la técnica de *patch-clamp*, en donde se encontró que el efecto del penfluridol sobre la actividad del Kv10.1 es dosis-dependiente con una $IC_{50} \sim 3 \mu M$.

Para evaluar los efectos de la inhibición de la actividad de Kv10.1 sobre aspectos funcionales se realizaron experimentos de viabilidad celular a través del marcaje de doble fluorescencia, así con ensayos migración celular usando el protocolo de cierre de la herida. La viabilidad celular no se vio afectada, no obstante, se observó una disminución en la tasa de migración de un 24% en HEK-Kv10.1 en presencia de penfluridol. Además, se observó que el penfluridol modificaba la morfología de las células HEK-Kv10.1 haciendo que las células pasaran de una morfología alargada ($CMC = 1.8 \pm 0.43$) a una morfología redondeada ($CMC = 1.17 \pm 0.14$).

Los hallazgos encontrados sugieren que el penfluridol es un fármaco potente como bloqueador del canal Kv10.1 en comparación con otros bloqueadores anteriormente identificados y los cambios detectados en términos funcionales son concordantes con la literatura que ha postulado a este fármaco como un tratamiento potencial para diferentes tipos de cáncer que van desde cáncer de pulmón, de mama triple negativo, de páncreas, entre otros.

1. Introducción

1.1. Perspectiva histórica de bioelectricidad y canales iónicos

Los inicios de la electrofisiología se remontan a los años 1780 con los experimentos de Luigi Galvani, seguidos por los experimentos de Carlo Matteucci quien en 1800 se sirvió de un galvanómetro para detectar corrientes en tejidos biológicos; así mismo, es pertinente mencionar a Emil du Bois-Reymond, quien, impulsado por los dos pioneros de la electrofisiología, identificó un flujo de “moléculas eléctricamente cargadas” en tejido nervioso y muscular, hoy se sabe que se refería a los iones y que el flujo que detectó explica la excitabilidad celular, motivo por el cual se le es considerado como el padre de la electrofisiología moderna (Fermini, 2008).

Más tarde, en 1952 el punto de inflexión que marcó la consumación de principios experimentales se dio con las aportaciones de Hodgkin y Huxley quienes describieron la relación entre el potencial de membrana y las corrientes iónicas, además, se percataron de que el flujo de cargas se daba en regiones localizadas de la membrana plasmática (Aidley David J. & Standfield Peter R., 1996). Ellos realizaron un modelo matemático (*HH-model*) que describe y predice la participación de canales permeables a sodio y potasio en el potencial de acción del axón gigante del calamar (Hodgkin & Huxley, 1952).

Los canales iónicos son proteínas transmembranales formadoras de poro que modulan la entrada o salida de iones de las células, están conformados por varias subunidades que varían en función de la subfamilia a la que pertenezcan. Cada una de las subunidades, presentan una región hidrofóbica transmembranal que favorece su anclaje en la membrana. Los canales iónicos se encuentran presentes en todo tipo de células, se expresan en la membrana plasmática y en la membrana de organelos intracelulares (Aidley David J. & Standfield Peter R., 1996). La movilización de los iones a través de los canales iónicos juega un papel fundamental en un contexto fisiológico ya que desempeñan un amplio repertorio de funciones que pueden ir desde la señalización celular, regulación del volumen celular, hasta la modificación del potencial de membrana en reposo (PMR) (Zheng et al., 2015).

El PMR de las células es resultado de la distribución asimétrica de los iones entre el medio intracelular con respecto al medio extracelular, de manera, que el PMR de células excitables tiende a presentar valores negativos de entre -40 y -95 mV (Hille, 2001).

1.2. Clasificación de canales iónicos

Los canales iónicos generalmente se clasifican de acuerdo con dos criterios particulares: 1) su selectividad, es decir, la permeabilidad que presentan ante un ion determinado (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-), y 2) por los estímulos que desencadenan su activación (o *gating*), pudiendo activarse ante estímulos mecánicos, cambios de voltaje, de temperatura, de pH y por unión a ligandos externos tales como neurotransmisores o ligandos internos como Ca^+ , nucleótidos cíclicos, entre otros (Alberts et al., 2016). Cabe destacar que, en algunas ocasiones, los canales activados por unión a ligando pueden ser activados por múltiples estímulos (Aidley David J. & Standfield Peter R., 1996).

1.3. La superfamilia de canales iónicos de potasio

Existe una enorme variedad de canales iónicos de potasio los cuales se encuentran presentes en todos los reinos biológicos a excepción de algunos parásitos o bacterias simbióticas (Kuo et al., 2005). La gran superfamilia de canales iónicos de potasio se subdivide en función de su estructura y funcionamiento, razón por la cual se han clasificado en cuatro grandes clases: canales activados por voltaje (Kv), canales rectificantes de entrada (Kir), de dominio de Poro en Tándem (K2P) y canales activados por calcio (K_{Ca}) (Kuang et al., 2015).

La estructura de dichos canales puede llegar a contener de 2 a 6 hélices transmembranales e independientemente de la clase a la que pertenecen, presentan dos regiones fundamentales para su correcto funcionamiento: el dominio formador de poro (DP), el cual permite el paso de iones de K^+ y, por otro lado, un dominio sensor de voltaje (DSV), el cual se encarga de sensar diferentes estímulos que varían en función de la subfamilia (Kuang et al., 2015). Los canales de K^+ se caracterizan por presentar la secuencia de residuos de aminoácidos -XGYG- en cada asa P en la región formadora del poro, lo que promueve la formación del filtro selector para permitir el movimiento de iones K^+ a través de ellos (Hille, 2001).

El ensamblaje de las 4 subunidades consiste en el acoplamiento funcional de DSV con DP y adquieren un arreglo cuadrado que se caracteriza por presentar los 4 DP en el centro rodeadas por los DSV. Los canales de la familia Eag se caracterizan por tener un

arreglo en el que cada VSD entra en contacto con el PD de la subunidad adyacente (Barros et al., 2020).

En esta tesis nos enfocaremos en el canal de potasio perteneciente a la subfamilia de canales activados por voltaje, el Kv10.1.

1.4. El canal Kv10.1, generalidades

1.4.1. Antecedentes históricos

En 1969, Kaplan & Trout, encontraron mutantes de *Drosophila melanogaster* las cuales presentaban un temblor vigoroso en las extremidades cuando eran anestesiadas con éter. En una de estas moscas mutantes se identificó que el gen responsable de dicho fenotipo codificaba para un canal iónico selectivo a potasio, el canal Kv10.1, en ese entonces se nombró como EAG1 (por *ether-à-go-go 1*), dado que fue el primer canal descubierto en su tipo. Posteriormente, se le dio el nombre de Eag a la subfamilia de canales de potasio activados por voltaje (Kv), que tienen homología estructural con el Kv10.1, dicha familia es conocida por el nombre del gen base KCNH, el cual es codificante para las subunidades de los tres subtipos de canales (Eag, Erg y Elk) contemplados en la familia tal como se puede apreciar en la figura 1.

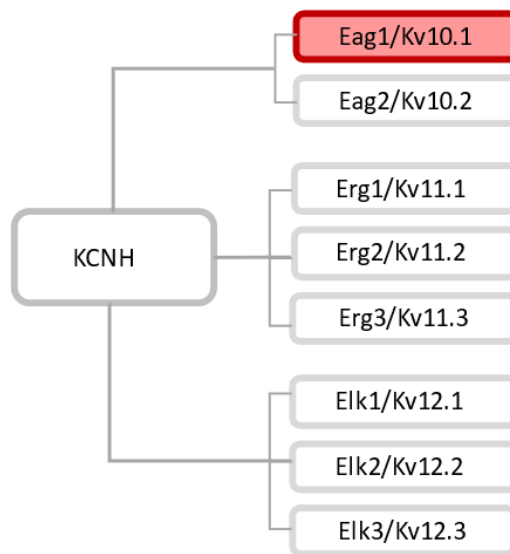


Figura 1 Relaciones de parentesco de la familia KCNH. Modificado de Xuzhao et al., 2017.

Más tarde en 1998, Occhiodoro y colaboradores aislaron el gen KCNH humano, lo clonaron y lograron su expresión funcional en mioblastos en proceso de diferenciación por lo que,

además, fue posible caracterizar la cinética de activación del canal (Occhiodoro et al., 1998). Tras transfectar dicho canal en ovocitos de *Xenopus laevis*, se identificó la participación del Kv10.1 en la progresión del ciclo celular (Pardo et al., 1998) y fue un año más tarde cuando dilucidaron la sobreexpresión del canal en aproximadamente el 70% de las muestras de tumores obtenidos en clínica y fue a partir de este hallazgo cuando se comenzó a arar el terreno para proponerlo como un blanco farmacológico para tratar el cáncer, así como describirlo como un canal oncogénico (Pardo et al., 1999).

1.4.2. Estructura, expresión y función

1.4.2.1. Estructura

El canal Kv10.1 (codificado por el gen KCNH1) es un complejo proteico homotetramérico con un peso de 111,423 Da. Cada una de sus 4 subunidades está compuesta por 6 hélices alfa transmembranales (S1-S6) dentro de las cuales se encuentra el dominio sensor de voltaje (VSD) (S1-S4), cuyo segmento S4 contiene residuos cargados positivamente (Arg, Lys) de tal manera que al estar expuesto a potenciales muy positivos se desencadenan cambios conformacionales acoplados a la región formadora del poro (PD) (S5-S6) mediante un asa conectora corta de 5 residuos entre el S4 y S5 (Whicher & MacKinnon, 2016). La selectividad del canal hacia K⁺ se da mediante la región P conectora de S5 y S6 que contiene una secuencia altamente conservada entre los canales Kv -MTXVGXG- (Heginbotham et al., 1994; (Whicher & MacKinnon, 2016).

Al igual que otros canales de potasio activados por voltaje, los extremos amino- y carboxilo terminal del Kv10.1 son intracelulares, no obstante, dichas regiones son muy grandes y tienen diferentes dominios funcionales (Warmke et al., 1994). En el extremo amino terminal se presentan: un dominio de unión a calmodulina (CaMBD) y el dominio Per-Ant-Sim (PAS), mientras que en el extremo carboxilo terminal se encuentran: C-linker, un dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBDH) y dos dominios CaMBD (X. Wang et al., 2017).

1.4.2.2. Expresión y función

El canal Kv10.1 se expresa de manera regular en tejido nervioso en donde abunda específicamente en el bulbo olfatorio, la corteza cerebral, el hipocampo, el hipotálamo y cerebelo tanto en roedores como en humanos y se ha evidenciado su expresión en dendritas

neuronales y postsinápticas (Ouadid-Ahidouch et al., 2016). En lo que respecta a la localización subcelular, se expresa en la membrana plasmática, pero también se ha observado su expresión funcional en la membrana nuclear y de acuerdo con Chen y colaboradores, la expresión en la membrana nuclear sugiere su participación en la homeóstasis nuclear de K⁺ e incluso en la expresión génica mediante la interacción indirecta con heterocromatina (Chen et al., 2011).

Pese a que se han realizado numerosos estudios respectivos a la funcionalidad del canal en tejido nervioso (Ouadid-Ahidouch et al., 2016), aún es incierta ya que en ratones *knock-out* no se presentaron anomalías en su desarrollo embrionario y hasta la adultez; la corteza y el hipocampo presentaron una morfología normal, de la misma manera, no presentaron alteraciones en niveles de ansiedad, conducta social, en memoria, ni en aprendizaje (Ufartes et al., 2013).

1.4.3. Biofísica

Cuando se grafican las corrientes iónicas generadas por la activación del canal Kv10.1 en función del voltaje, se puede observar que se comporta como un canal rectificante de salida, es decir una vez que se activa al estar expuesto a voltajes más despolarizados de -40 mV (Occhiodoro et al., 1998), favorece el flujo saliente iones de potasio del medio intracelular hacia el extracelular. En registros de corrientes macroscópicas se puede observar que el Kv10.1 genera corrientes que se activan lentamente y no muestran inactivación ante la despolarización sostenida (Bauer & Schwarz, 2001). Los registros de canal unitario muestran que el canal Kv10.1 de humano tiene una conductancia unitaria de 19.7 ± 1.4 pS (Zakany et al., 2019) y el voltaje medio de activación ($V_{1/2}$) es de 8.3 mV (Kotüm et al., 2015)

1.5. El rol de Kv10.1 en la progresión del cáncer

1.5.1. El cáncer y el potencial de membrana celular

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (2022) el cáncer es un padecimiento que ocupa una de las primeras causas de muerte a nivel mundial con un número aproximado de 10 millones de muertes registradas en 2020, lo que indica que seis de cada diez muertes fueron a causa de la enfermedad. El *National Cancer Institute* la define como una enfermedad en la que algunas células del cuerpo comienzan a crecer y proliferar de manera descontrolada e invaden otros tejidos, puede llegar a desarrollarse en cualquier parte del

cuerpo y a raíz de la acumulación de mutaciones como resultado de las altas tasas de replicación, las células afectadas adquieren un comportamiento anormal que, si bien pueden variar en función de los diferentes tipos de cáncer (National Cancer Institute, 2022), Hanahan y Weinberg identificaron 6 características distintivas del cáncer que denominaron *Hallmarks of Cancer* (Hanahan & Weinberg, 2000).

Dentro de las *Hallmarks of Cancer* se considera: la activación de vías de señalización que promueven la proliferación sostenida; la evasión de supresores de crecimiento; activación de invasión y metástasis; inducción de angiogénesis; resistencia a la muerte celular y la habilitación de inmortalidad replicativa. Dichas características se manifiestan como resultado de un enorme repertorio de vías de señalización con una amplia diversidad de mecanismos; sin embargo, en el presente escrito nos enfocaremos de manera particular en la participación del canal Kv10.1 en el desarrollo del cáncer pues se ha evidenciado su sobreexpresión en alrededor del 70% de tipos de cáncer (Hemmerlein et al., 2006; Martínez et al., 2015; Pardo et al., 1999).

Así mismo, se ha visto que el PMR se ve modificado en células cancerosas. El estado despolarizado de las células cancerosas lo evidenciaron Marino y colaboradores en 1994 tras registrar células extraídas de tumores malignos de diferentes tipos de cáncer en donde notaron el desplazamiento del PMR hacia voltajes más positivos al contrastarlos con el PMR de células somáticas sin alteraciones (Marino et al., 1994). Aunque los mecanismos moleculares implicados en que las células cancerosas adquieran un PMR más despolarizado no se conocen con certeza, se ha hipotetizado que ésta podría estar sujeta a la activación de canales de calcio como resultado de la hiperpolarización de la membrana a causa de la activación de canales de K^+ (Movsisyan & Pardo, 2020).

Además, dada la baja concentración de K^+ intracelular en células cancerosas aunado con el hecho de que el uso de bloqueadores de canales de K^+ tuvo un efecto importante sobre el restablecimiento del PMR, sugirieron que los canales selectivos para K^+ podrían tener una influencia mayor sobre las modificaciones de este parámetro en comparación con canales de Na^+ .

Un hecho que resulta relevante es que la prevalencia del PMR despolarizado en células cancerosas es concordante con la influencia de los cambios de potencial durante la progresión de las fases del ciclo celular (Carvalho, 2021). Para citar un ejemplo más específico, tanto las células cancerosas como las células troncales con mayor potencial

proliferativo presentan un PMR de entre -10 y -30 mV, mientras que las células diferenciadas con una tasa de proliferación reducida presentan valores entre -50 a -90 mV (Levin & Stevenson, 2012).

Por lo tanto, se ha propuesto al cáncer como una oncocanalopatía, la cual está definida como estados patológicos que se desencadenan por una expresión aberrante de un canal iónico determinado de manera que puede apoyar la señalización requerida para la expresión de un fenotipo anormal (Prevarskaya et al., 2018).

1.5.2. Implicaciones del canal Kv10.1 en las *Hallmarks del cáncer*

1.5.2.1. Proliferación y progresión del ciclo celular

La proliferación sostenida es un comportamiento típico de células neoplásicas que se desarrolla a partir de una serie de vías de señalización alteradas las cuales promueven la división mitótica deliberada de forma autocrina y mediante la liberación de factores de crecimiento (Hanahan & Weinberg, 2011) y un hecho que ha llamado la atención es el incremento en la tasa de proliferación como resultado de la sobreexpresión inducida del canal Kv10.1.

En 2016 Sánchez y colaboradores identificaron que la expresión del canal Kv10.1 no se limita a tejidos nerviosos como lo habían indicado anteriormente Martin y colaboradores en 2008, sino que también se expresa ectópicamente en la región basal del cilio primario y de manera efímera en células somáticas de vertebrados en donde se han identificado con mayor incidencia en células con altas tasas de replicación tales como las células troncales de epitelio intestinal (Martin et al., 2008; Sánchez et al., 2016; Urrego et al., 2016), específicamente durante la fase de transición G2/M del ciclo celular (Napoli et al., 2022).

La expresión periódica del canal se ha visto que está regulada por la vía pRb/E2F1 en donde el factor de transcripción E2F1 regula la expresión a través de la unión a regiones promotoras del Kv10.1 (Urrego et al., 2016). Sin embargo, también se ha evidenciado su expresión funcional en la membrana nuclear en donde se sugiere que podría participar en la regulación homeostática de las concentraciones de K⁺ en el lumen nuclear y que, además, podría interactuar indirectamente con la cromatina y de esta manera, influir sobre la regulación génica (Chen et al., 2011).

La expresión funcional del canal Kv10.1 en la región basal del cilio primario promueve la hiperpolarización de membrana lo cual desencadena la activación de diferentes canales

de Ca^{2+} (Napoli et al., 2022) y conforme la concentración de Ca^{2+} intracelular aumenta, recluta a la calmodulina (CaM) (Movsisyan & Pardo, 2020) lo que a su vez activa a la quinasa Aurora A (AURKA por sus siglas en inglés *Aurora Kinase A*) que es la proteína efectora de la reabsorción del cilio primario (Nishimura et al., 2021). El cilio primario es una estructura temporal que sigue un ciclo de formación y reabsorción en coordinación con las etapas de transición G0/G1 y G2/M respectivamente. Por lo tanto, la fase de reabsorción del ciclo del cilio primario además de involucrarse en la activación de diferentes vías de señalización desencadenadas a partir de AURKA (Por sus siglas en inglés *Aurora Kinase A*) (Véase en Fig. 2), deja a los microtúbulos disponibles para la formación del huso mitótico en pro de la segregación cromosómica (Kasahara & Inagaki, 2021).

En 2020 Movsisyan & Pardo encontraron que la actividad del canal Kv10.1 detiene la activación de SAC (por sus siglas en inglés *Spindle Assembly Checkpoint*) que es un punto de control que impide la segregación cromosómica si los cinetocoros no se han unido correctamente a los microtúbulos del huso mitótico por lo que la actividad del canal incrementa la tasa de replicación del DNA (Movsisyan & Pardo, 2020); además observaron que existe relación entre el estado despolarizado de la membrana como efecto de la actividad del canal Kv10.1 y la activación de canales de Ca^{2+} como el ORAI1 (Movsisyan & Pardo, 2020b; Peretti et al., 2019) que a su vez desencadenan oscilaciones en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ cuyo incremento pareciera ser el motor que media parte de la dinámica microtubular.

Es posible que dichas modificaciones en la dinámica microtubular se den como consecuencia de dos efectos opuestos de la calmodulina mediados por las interacciones de proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs) en donde en presencia de las MAPs la calmodulina confiere una alta sensibilidad a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y dicha sensibilidad inhibe la polimerización y por otro lado, en ausencia de MAPs la calmodulina secuestra al $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y promueve la polimerización de las fibras de tubulina (Lee & Wolff, 1982).

1.5.2.2. Migración y metástasis

La progresión maligna del cáncer se define –en gran medida– por la metástasis y angiogénesis. Los procesos metastásicos son aquellos en los que los tumores primarios se disgregan hacia otras regiones mediante su inserción en el torrente sanguíneo y su instalación en tejidos secundarios de manera que inician la formación de colonias en órganos distintos al de su origen y, por lo tanto, en entornos fisiológicos con una mayor disponibilidad

de nutrientes (Fares et al., 2020; Hanahan & Weinberg, 2000). Es por esta razón que su progresión se ve favorecida por la motilidad celular la cual se evalúa a partir de la migración celular.

Además de la proliferación sostenida, tanto el aumento de la dinámica microtubular como la disponibilidad de su maquinaria que son procesos liderados en gran medida por la participación del canal Kv10.1, resultan ser clave para la migración celular lo cual se ha evidenciado mediante la colocalización del canal con adhesiones focales, cuyo funcionamiento involucra cascadas de señalización con actores moleculares tales como FAK (por sus siglas en inglés *Focal Adhesion Kinase*) e integrinas (Herrmann et al., 2012).

1.5.2.3. Angiogénesis

En lo que concierne a la angiogénesis, se trata del proceso de neovascularización mediante el cual los tumores desarrollan vasos sanguíneos como respuesta ante la privación de nutrientes, así como a la deficiente oxigenación de los tejidos. Esta característica distintiva del cáncer se manifiesta como consecuencia de la sobrerregulación de HIF-1 α (*Hipoxia Inducible Factor 1 α*) y VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) y tal como lo han evidenciado Downie y colaboradores (2008), aún con variantes no conductoras del canal Kv10.1, la presencia del Kv10.1 regula la expresión de ambos promotores de la angiogénesis independientemente de su actividad canónica.

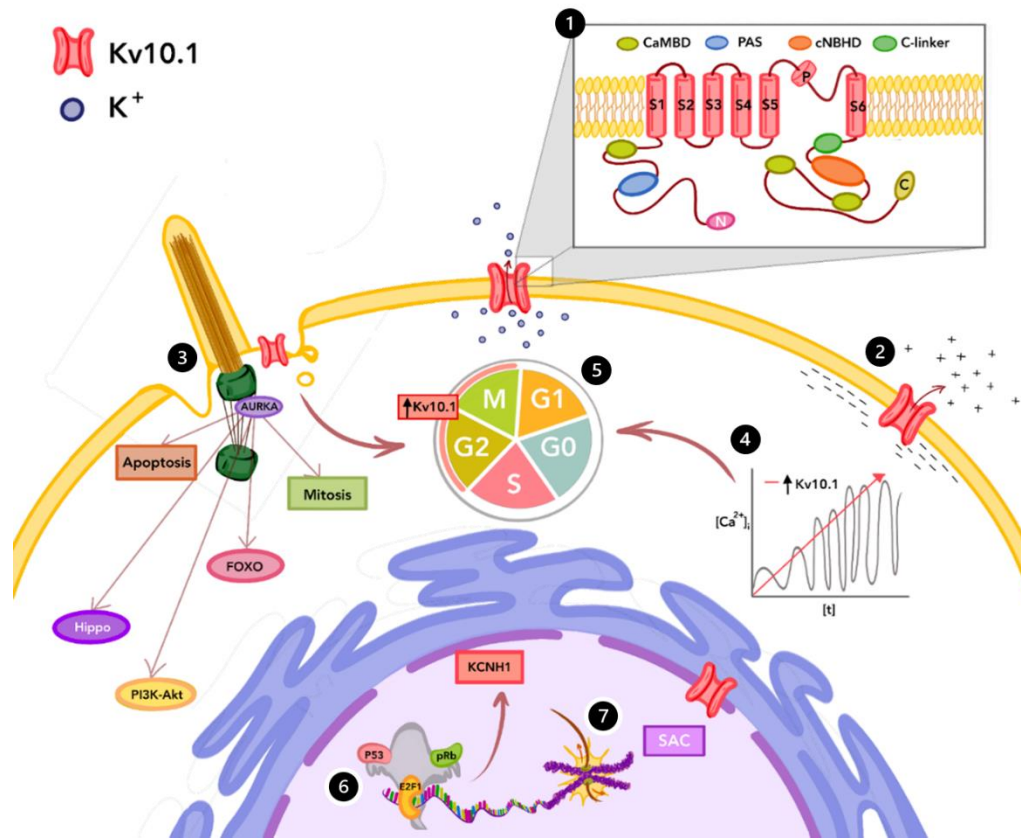


Figura 2 Participación del canal Kv10.1 en las *Hallmarks* del cáncer. Modificado de Luis et al., 2022. 1) esquema que muestra la estructura de una subunidad del canal Kv10.1; 2) el canal Kv10.1 se activa por la despolarización del potencial de membrana, lo permite la salida de iones K^+ de la célula; 3) la apertura del canal Kv10.1 en la región basal del cilio primario hiperpolariza la membrana, lo que incrementa el *driving force* para Ca^{2+} , lo que desencadena la reabsorción del cilio primario y con ello la activación de procesos celulares o activación de rutas específicas; 4) los niveles de expresión funcional del Kv10.1 se ha visto que influye sobre las oscilaciones de calcio intracelular; 5) la expresión temporal del canal en células con altas tasas de proliferación se limita a las fases G2/M y tanto la reabsorción del cilio primario como el incremento de oscilaciones de Ca^{2+} son relevantes durante dicha fase de transición; 6) el factor de transcripción E2F1 regula la expresión del gen KCNH1, que codifica para las subunidades del Kv10.1. Dos de las proteínas que regulan la actividad de E2F1 son p53 y pRb, los cuales se encuentran pobremente expresados en tejido canceroso; 7) la actividad del canal Kv10.1 detiene la activación de SAC, un checkpoint que verifica la correcta unión de los cinetocoros a los microtúbulos del huso mitótico durante la segregación cromosómica.

1.6. El canal Kv10.1 como blanco terapéutico

1.6.1. Farmacología

Tal como lo mencionan Luis y colaboradores, el canal Kv10.1 es un blanco terapéutico prometedor para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer no sólo por la sobreexpresión anómala en tejidos cancerosos, sino también por los numerosos procesos en los que su actividad se ve implicada en el avance de las características distintivas del cáncer (Luis et al., 2022). Por lo tanto, desde hace poco más de dos décadas ha comenzado una carrera

imparable por encontrar inhibidores de su actividad canónica, para ello las principales postulaciones giran en torno a péptidos provenientes de venenos animales, anticuerpos, y moléculas pequeñas (Loza-Huerta et al., 2021; Toplak et al., 2021).

Dentro de los péptidos provenientes de venenos animales se han postulado péptidos extraídos de venenos de arácnidos (Ma et al., 2018), serpientes (Boldrini-França et al., 2020), e incluso de anémonas (Moreels et al., 2017) y, pese a que han demostrado tener gran especificidad al canal y un efecto antitumoral relevante, la postulación de dichos péptidos a nivel clínico se dificulta en el proceso de síntesis y plegamiento, especialmente en péptidos de cadena larga (Lewis & Garcia, 2003). Por otra parte, los anticuerpos específicos para bloquear el poro del canal han presentado resultados prometedores (Gómez-Varela et al., 2007; Hartung et al., 2011) al igual que los nano-anticuerpos (Hartung et al., 2020).

De acuerdo con Toplak y colaboradores (2021), se ha identificado un gran número de moléculas pequeñas que actúan como inhibidores de la actividad del canal Kv10.1 mediante la interacción con sitios como la región formadora del poro: Tetraetilamonio, ICA105574, Quinidina, Astemizol, Clofilio, LY97241, Imipramina, Dronedarona, Cloroquina, Haloperidol, MK-499, Dofetilida, Cisaprida, E4031, Terfenadina, Tetrabutilamonio; o con el dominio sensor de voltaje (S1-S4): Mibefradil, Amiodarona, análogo No. 5 de Purpurealidina y 20(S)-gingsenoside Rg3; la región C-linker: Tetrandrina, Procianidina y en el dominio PAS: Clorpromazina.

Y aunque la inhibición de la actividad del canal mediante las moléculas anteriormente mencionados ha demostrado reducir la tasa de crecimiento tumoral, aún existen retos por afrontar. Esto se debe a que las moléculas inhibitoras del canal Kv10.1, también pueden afectar la actividad del canal Kv11.1 (hERG), el cual presenta un enorme parentesco estructural con el canal Kv10.1 y se encuentra estrechamente involucrado en la repolarización de potenciales de acción cardiacos (Priest et al., 2008), por lo que su uso y las dosis en clínica deben tomarse con precaución ya que podrían desencadenarse arritmias cardiacas dependiendo de la distribución así como de los mecanismos de absorción.

1.6.2. Técnicas de screening

Durante las últimas décadas el estudio de canales iónicos ha adquirido mayor relevancia por lo que también se han desarrollado diferentes técnicas de screening dentro de las cuales se

encuentran: 1) ensayos de unión a radio ligando, 2) ensayo de flujo de iones, 3) ensayos de fluorescencia indicativos de cambios en el potencial de membrana (Fermini, 2008).

Los ensayos de unión a radio-aligando se diseñaron en la década de los 60's y consisten en el uso de un ligando de alta afinidad etiquetado con un marcador radiactivo (o radio-ligando) que se une al sitio de interés del canal iónico, de manera que si el ligando no marcado desplaza al radio-ligando significa que el primero compite por el sitio de unión al canal y por tanto presenta mayor afinidad. Si bien esta técnica puede resultar informativa de los sitios de unión, también tiene limitaciones en lo que respecta a la identificación de cambios funcionales en el canal debido a que no distingue agonistas de antagonistas y, además, puede llegar a modificar la actividad del canal.

Por su parte, los ensayos de flujo de iones consisten el uso de isótopos radiactivos ($^{22}\text{Na}^+$, $^{45}\text{Ca}^{2+}$, $^{86}\text{Rb}^+$) selectivos para los canales iónicos de interés. Para ello las células que sobre expresan los canales iónicos en cuestión se incuban en un buffer con alguno de los isótopos radiactivos mencionados y posteriormente se hace un conteo de los isótopos que se internalizaron en la célula de manera que es posible cuantificar cambios en la permeabilidad de los canales dependiendo de los tratamientos a los que se expongan. Parte de las desventajas de este método reside en la baja resolución de los resultados (Yu et al., 2016).

Los *screenings* o tamizajes primarios de fluorescencia de alto rendimiento, se basan en el marcaje de cambios en el PMR, así como en los cambios en la concentración intracelular iónica mediados por la actividad de los canales iónicos de interés en poblaciones homogéneas de células (HEK293, CHO). En el caso específico de los *screenings* en canales de potasio, se utilizan marcadores sensibles a talio (Tl^+); de manera que el Tl^+ se internaliza a través del poro de los canales de potasio tras inducir su activación con altas concentraciones de K^+ y FLIPR de potencial de membrana (FLIPR-MP). El FLIPR-MP es un marcador patentado por Molecular Devices que ha demostrado reducir el ruido en las mediciones, así como el tiempo de incubación requerido (Fairless et al., 2013; Yu et al., 2016)

1.6.3. Nuestros *screenings* en el LaNCa

En el Laboratorio Nacional de Canalopatías se han corrido tamizajes primarios de fluorescencia de alto desempeño para la búsqueda de moduladores de la actividad del canal Kv10.1. Dicho abordaje se ha llevado a cabo a través de ensayos de fluorescencia sensibles

a talio (Tl^+ ion que puede moverse a través de canales permeables a K^+), lo que permitió a Loza-Huerta y colaboradores describir a la loperamida como un inhibidor del canal Kv10.1 (Loza-Huerta et al., 2021). Más recientemente se han comenzado a utilizar ensayos de fluorescencia asociados a cambios en el potencial de membrana y los cuales han mostrado resultados prometedores (Gómez-Herrera et al., 2023).

Dentro de las moléculas evaluadas, el penfluridol disminuyó la intensidad de fluorescencia en células HEK-Kv10.1. Tal como se puede observar en la figura 3, las células HEK-Kv10.1 en la situación control (marcado en negro) mostraron un aumento en la señal de fluorescencia cuando eran estimuladas con alto potasio (60 mM KCl), en contraste las células que fueron incubadas con penfluridol a 100 μ M (marcado en rojo) la intensidad de la señal fue significativamente menor ($P=0.0421$).

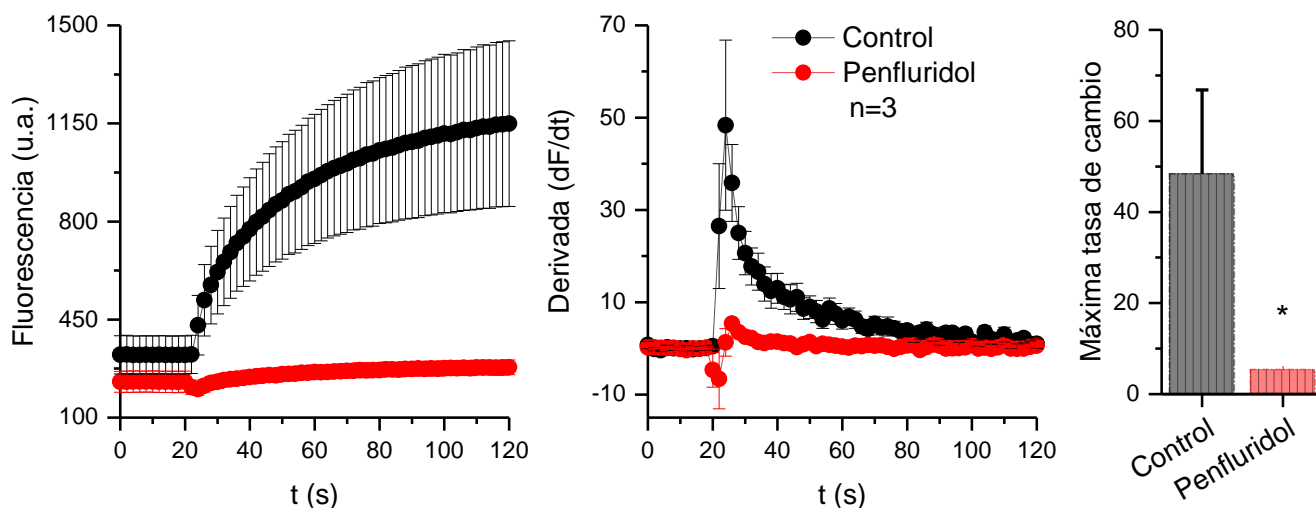


Figura 3 Resultados del screening con FLIPR de potencial de membrana en HEK-Kv10.1 A) Se muestra la reducción de unidades de fluorescencia tras un periodo de incubación de 30 minutos de HEK293-Kv10.1 en penfluridol a 100 μ M y en presencia del estímulo (KCl 60 mM). B) Se muestra la primera derivada que evidencia la tasa de cambio de las células HEK293-Kv10.1 preincubadas con penfluridol con respecto al control. C) Las unidades de fluorescencia de las células tratadas con penfluridol mostraron una reducción significativa (T de Student no pareada, $P=0.0421$) aún en presencia del estímulo.

1.7. El antipsicótico penfluridol

El penfluridol ($C_{28}H_{27}ClF_5NO$) es un antipsicótico derivado de la difenilbutilpiperidina de primera generación con un logP de 7.3 lo que indica que es un compuesto muy lipofílico (National Center for Biotechnology Information, 2023a) con un peso molecular de 524 g/mol. Este medicamento está indicado para el tratamiento de esquizofrenia crónica y otros

desórdenes psicóticos. En lo que respecta a sus características farmacodinámicas, el penfluridol posee una vida media de 66 horas en plasma sanguíneo (Claghorn et al., 1979) y las dosis orales semanales recomendadas oscilan entre 40 y 80 mg/Kg (Cooper et al., 1975; Tuan & Lee, 2019).

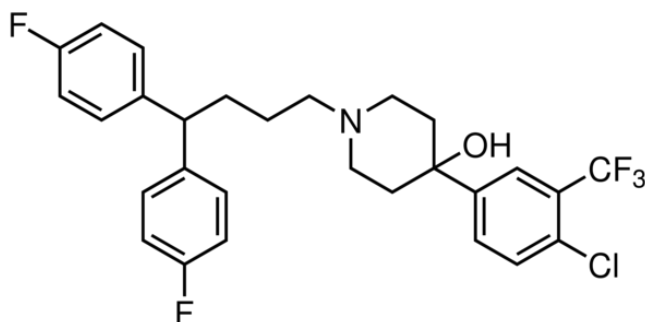


Figura 4 Estructura química del penfluridol. CAS: 26864-56-2

1.7.1. Propiedades antitumorales del penfluridol

De manera adicional a su efecto como antipsicótico, en los últimos años, se ha identificado la administración localizada de penfluridol en solución inyectable como una potencial quimioterapia (Tuan & Lee, 2019) debido a que se ha visto que detiene la progresión del crecimiento tumoral y metástasis. La inhibición del crecimiento tumoral se ha evidenciado en células de cáncer de pulmón (Xue et al., 2020); en cáncer de mama triple negativo *in vivo* e *in vitro* (Ranjan et al., 2016); y en células de cáncer de páncreas *in vivo* e *in vitro* (Ranjan & Srivastava, 2016). En lo que concierne a la metástasis, esta se vio inhibida en un 76% y en un 60% en migración e invasividad respectivamente en cáncer de mama triple negativo tras la exposición de penfluridol a 4 μ M durante 36 h (Ranjan et al., 2015).

No obstante, aún no hay un consenso claro sobre los mecanismos de acción que desencadenan el efecto antitumoral del penfluridol (Tuan & Lee, 2019). Algunos autores sugieren que podría estar relacionados con diferentes blancos moleculares tales como se muestran en la tabla 1.

Hasta el momento, dentro de los blancos moleculares que se han relacionado con este efecto, sólo se ha encontrado un tipo de canales iónicos que son los canales de calcio de tipo T (Santi et al., 2002). Aunque se sugiere que el efecto inhibitorio del penfluridol sobre dichos canales podría explicar el potencial anticanceroso dado que su inhibición decrementa la tasa de proliferación e incrementa la tasa de muerte celular en células cancerosas

(Dziegielewska et al., 2014), aún no se ha confirmado a nivel experimental sobre líneas celulares cancerosas (Tuan & Lee, 2019). Y siguiendo sobre esta línea, la interacción del penfluridol con el canal de potasio activado por voltaje Kv10.1 no ha sido descrita aún.

Tabla 1 Posibles mecanismos que explican el efecto antitumoral del penfluridol.

Interacción sugerida	Tipo celular	Participación de blanco en la evolución del cáncer	Referencia
Interacción con receptores de Dopamina de tipo 2 (DRD2)	Células cancerosas de riñón	Los DRD2 se encuentran asociados a algunas de las conductas típicas de células cancerosas tales como proliferación, apoptosis y autofagia.	(Tung et al., 2022; X. Wang, Wang, et al., 2019)
Inhibición de la actividad de canales de Ca ²⁺ de tipo T (Kd 70-100 nM)	HEK293	La supresión de la expresión de canales de Ca ²⁺ de tipo T inhibieron la proliferación e incrementaron la tasa de muerte celular en células cancerosas.	(Dziegielewska et al., 2014; Tuan & Lee, 2019; Santi et al., 2002)
Supresión de integrinas de tipo α6, β4, así como proteínas implicadas sus vías de señalización (Fak, paxilina, Rac1/2/3 y ROCK1)	Células de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231, HCC1806, 4T1).	Las integrinas de tipo α6β4 se encuentran sobreexpresadas en cáncer de mama triple negativo y se han asociados a la progresión de la metástasis.	(Hwa Soung et al., 2011; Ranjan et al., 2015)
Inhibición de la liberación de factores de crecimiento endotelio-vascular	Células venosas de cordón umbilical humano (HUVECs) Células de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231)	La liberación de VEGFs es fundamental para la neovascularización tumoral, puesto que es la manera en la que las células cancerosas establecen un suministro continuo de nutrientes que favorecen su crecimiento.	(Srivastava et al., 2020)

Además, se encontró que el penfluridol puede actuar como un antagonista del canal hERG (Silvestre & Prous, 2007) y pese a que se deben tomar ciertas precauciones con fármacos de este tipo, el penfluridol ha mostrado ser un medicamento seguro y apto para utilizarse en extenso en la práctica clínica con ciertas restricciones a personas con enfermedades cardiovasculares ya que la combinación del fármaco con enfermedades de dicha índole, podrían desencadenar fatalidad potencial (Taylor et al., 2021).

2. Justificación

Los diversos enfoques para el tratamiento del cáncer han tenido aproximaciones prometedoras, sin embargo, el cáncer visto como una oncocanopatía ofrece un área de oportunidad interesante (Felipe et al., 2006; Prevarskaya et al., 2018), especialmente si nos enfocamos en el canal Kv10.1 que se sobreexpresa en un 70% de los tipos de cáncer estudiados en clínica y cuyo papel en la progresión de las características distintivas del cáncer es innegable (Luis et al., 2022; Ouadid-Ahidouch et al., 2016). Por esta razón, existe un creciente interés por encontrar nuevas moléculas inhibitoras del canal Kv10.1 y pese a que ya se ha encontrado un amplio repertorio de moléculas con dicho efecto, varias de ellas son moléculas de acción inespecífica lo cual limita su postulación en el área clínica.

Y dado que los tamizajes primarios con técnicas de fluorescencia que se corrieron en el LaNCa mostraron un posible efecto inhibitorio del penfluridol sobre la actividad del canal sobre una densidad poblacional celular relativamente grande, es necesario realizar la caracterización de este efecto con experimentos electrofisiológicos en células individuales y que sobre expresen el canal de manera estable. Dichos ensayos permiten observar la actividad del canal en tiempo real y verificar si la inhibición de las corrientes del canal de interés está directamente relacionada con la actividad del fármaco.

3. Hipótesis

El penfluridol inhibe al canal oncogénico de potasio Kv10.1. Como resultado de dicha inhibición, algunos de los procesos celulares relacionados con la sobreexpresión del canal se verán disminuidos.

4. Objetivo general

Evaluar, a través de experimentos de electrofisiología, el efecto inhibitor del penfluridol sobre la actividad del canal Kv10.1 y determinar mediante ensayos funcionales si tiene efectos sobre procesos celulares asociados a la sobreexpresión de dicho canal.

4.1. Objetivos particulares

- Determinar mediante la técnica de *patch-clamp* si el penfluridol inhibe las corrientes del canal Kv10.1 expresado en la línea celular HEK-Kv10.1.
- Construir la curva dosis-respuesta a partir de registros electrofisiológicos.
- Evaluar si la modulación del canal Kv10.1 por penfluridol puede afectar las propiedades de viabilidad y migración de las células HEK-Kv10.1.
- Determinar si el penfluridol modifica la morfología de las células HEK-Kv10.1.

5. Materiales y métodos

5.1. Cultivo celular

Para los experimentos de esta tesis se utilizaron las líneas celulares HEK293 (*Human Embryonic Kidney*, por sus siglas en inglés) silvestre (WT) y la línea celular HEK-Kv10.1 la cual expresa de forma estable el canal Kv10.1 de humano (amablemente donadas por el Dr. Walter Stühmer y Luis A. Pardo del *Max-Planck-Institute of Experimental Medicine*, Göttingen). Es importante señalar que el PMR de las células WT es de -5.7 ± 1.0 mientras que el de las HEK-Kv10.1 es de -44.4 ± 1.5 (Gutiérrez García, 2022).

El medio de cultivo para ambas líneas celulares se preparó en una proporción de 89% de Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM) de alta glucosa (11965092, Gibco) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (26140087, Gibco), 1% de penicilina-estreptomicina (15140122, Gibco) y en el caso particular de HEK293-Kv10.1 se adicionó Zeocina 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (R25001, Invitrogen) como antibiótico de selección. Ambas líneas celulares fueron incubadas a una temperatura de 37 °C con una presión parcial de CO₂ al 5%.

5.2. Registros electrofisiológicos: *Patch-Clamp*

Para los registros electrofisiológicos, las células fueron sembradas en portaobjetos circulares con un diámetro de 12 mm previamente tratados con poli-D-lisina (MFCD00131934, Sigma Aldrich). Los cristales con células se incubaron de 12-24 h antes de ser registradas. Transcurrido ese tiempo, se montaron los cristales en la cámara de registro, la cual se montó en un microscopio invertido de fluorescencia (Nikon Eclipse Ti-U), con solución extracelular compuesta por (en mM): 137 NaCl, 5.4 KCl, 1.2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 Glucosa, 10 HEPES, la cual se ajustó a un pH de 7.4 con NaOH y con una osmolaridad de 300 ± 5 mOsm. Cabe destacar que bajo estas condiciones experimentales el potencial de equilibrio teórico para el ion K⁺ es de -83 mV.

Los registros se realizaron a temperatura ambiente (18-25 °C) con la técnica de *patch-clamp* en la configuración de fijación de voltaje (*voltage-clamp*) en la modalidad de célula completa (*Whole-cell*) a una frecuencia de muestreo de 10 kHz utilizando un amplificador Multiclamp 700B (Molecular Devices) acoplado a un conversor analógico digital Axon-

Digidata 1550 (Molecular Devices). Tanto el manejo de estímulos como la recolección de datos se ejecutó en el programa pClamp versión 10.4 (Molecular Devices).

En la figura 5 se muestran los protocolos utilizados para evaluar la corriente de K⁺ en las células HEK-293 WT y HEK-293 Kv10.1, en ambos protocolos se fijó el voltaje a -70 mV: en A se muestra el protocolo IV y en B el protocolo de pulso fijo a +50 mV; en el caso del pulso fijo, éste se configuró para generar pulsos cada 5 s. Para la ejecución de este experimento se utilizaron pipetas de borosilicato (IB12F-4, Kwik-Fill) con resistencias de entre 2-5 MΩ llenas de solución intracelular compuesta por (en mM): 140 KCl, 1 MgCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES. Esta solución se ajustó a un pH de 7.4 con KOH y presentó una osmolaridad de 300 ± 5 mOsm. Tanto para el protocolo de pulso fijo como el de IVs, la corriente fue cuantificada en los últimos 2 ms de pulso de voltaje, y este valor de corriente graficado en función del tiempo o voltaje, respectivamente.

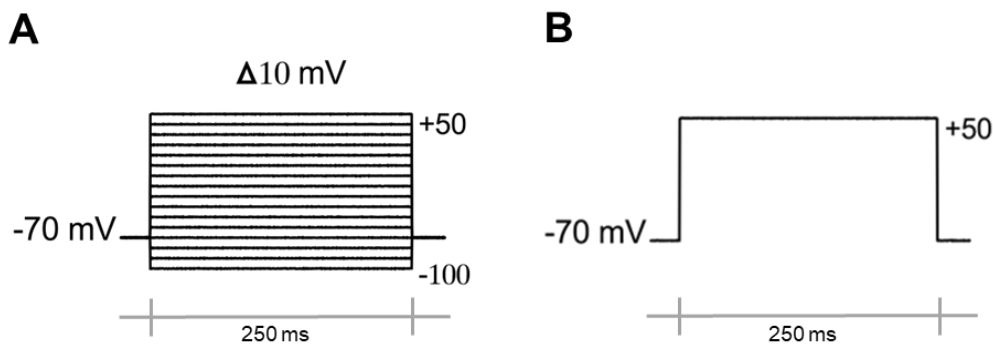


Figura 5 Protocolos utilizados para la obtención de registros de corrientes de K⁺ con la técnica de *patch-clamp*: En A se presenta un protocolo IV que consiste en la fijación de voltaje a -70 mV seguido por 16 pulsos de voltaje con una duración de 250 ms cada uno y que van desde -100 mV hasta +50 mV espaciados por un $\Delta 10$, al término de cada pulso el voltaje regresa a -70 mV; en B se muestra el protocolo de pulso fijo el cual consiste en la fijación del voltaje a -70 mV con una duración de 150 ms seguido por un pulso a +50 mV con una duración de 250 ms, al término del pulso el voltaje regresa a -70 mV durante 150 ms.

5.2.1. Construcción de curva de dosis-respuesta

Las células se mantuvieron en solución extracelular durante todo el tiempo de registro. Para cada célula se obtuvieron las corrientes generadas a partir del protocolo IV y pulso fijo a +50 mV, los cuales fueron utilizados para generar la gráfica de IV y el curso temporal del efecto del compuesto respectivamente. La adición del compuesto se realizó de manera simultánea con el protocolo de pulso fijo +50 mV y una vez que las corrientes alcanzaron estabilidad

durante al menos 1 min, se utilizó un sistema de perfusión por gravedad mediante el cual se administró penfluridol (PNFL) previamente diluido en DMSO y preparado a diferentes concentraciones (0.1, 1, 3, 10, 30 y 100 μM) en solución extracelular. La velocidad de flujo del equipo de perfusión es de 2.4 mL/min.

Para la construcción de la gráfica dosis-respuesta se realizó un ajuste con la ecuación de Hill computada por el programa OriginPro 2016, la cual se muestra a continuación:

$$\text{Inhibición} = V_{\text{max}} \left(\frac{X^n}{K^n + X^n} \right)$$

En donde, V_{max} es la inhibición máxima, x es la concentración de la molécula ensayada y n es el coeficiente de Hill.

5.3. Ensayos de viabilidad

La cuantificación de la viabilidad celular se obtuvo mediante la adquisición de imágenes de fluorescencia. El marcaje de células viables se realizó con el fluoróforo calceína-verde AM (C34852, Invitrogen) el cual fue excitada con una longitud de onda de 470 nm y la emisión se registró a 510 nm; por lo contrario, las células muertas o no viables, se tiñeron con yoduro de propidio (YP) (P1304MP, Invitrogen) que se excitó con una longitud de onda de 535 nm y se registró a 610 nm. La activación de la calceína-verde se desencadena una vez que el colorante entra en el citoplasma y las esterasas intracelulares eliminan los ésteres de acetometilo (AM), mientras que el YP se internaliza únicamente en células no viables que han perdido la integridad de membrana y se activa al unirse con las bases de DNA.

La adquisición de imágenes se llevó a cabo en el microscopio invertido de epifluorescencia ImageXpressXL (Molecular Devices) usando un objetivo con una magnificación de 40x. Para la realización de este ensayo, se utilizaron placas de 96 pozos previamente tratadas con matrigel (1:3) (CLS354234, Corning) en las cuales se sembraron células HEK-WT o HEK-Kv10.1 a una densidad de 1500 células/pozo las cuales se dejaron en incubación durante 20 y 24 h, pasado ese tiempo se añadieron los siguientes tratamientos: DMSO al 0.1%, TritónX-100 (NC0757899, Sigma Aldrich) al 0.1%, penfluridol a 1 μM , 100 nM y 10 nM.

Transcurridas las 24 h y 48 h de incubación con los respectivos tratamientos, se incubaron con ambos fluoróforos (calceína y yoduro de propidio) a 37°C durante 15 min en

medio de cultivo sin SFB; pasados los 15 min, se cambió el medio por PBS a fin de reducir la auto fluorescencia debida al rojo de fenol presente en los medios de cultivo.

El porcentaje de viabilidad se calculó como se muestra a continuación y mediante la comparación de células vivas y muertas:

$$\% \text{ de viabilidad} = \left(1 - \frac{\text{núm. de células muertas}}{\text{núm. de células muertas} + \text{num. de células vivas}} \right) 100$$

De manera adicional, se analizó la morfología celular a 24 y 48 h. Para ello, se midió el cociente indicativo de la morfología celular (CMC) en donde se tomó como eje mayor a la longitud mayor de la célula y el eje menor como la longitud base tal como se muestra en la figura 6.

$$CMC = \left(\frac{\text{Eje mayor}}{\text{eje menor}} \right)$$

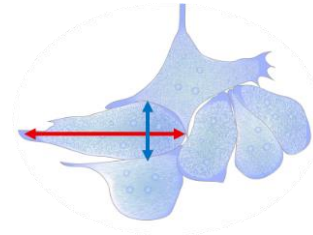


Figura 6 Cálculo de la morfología celular. En rojo se muestra el eje mayor y en azul el eje menor.

5.4. Ensayos de migración

Los ensayos de migración fueron evaluados a través de un ensayo de cierre de la herida el cual consiste en cuantificar la reducción de un área inicial a través de un proceso de migración celular. La adquisición de imágenes se realizó con el microscopio confocal ImageXpressXL (Molecular Devices) en campo claro y con un objetivo con una magnificación de 20x.

Antes de plantar las células de interés, se trataron placas de 24 pocillos con matrigel (1:3) para favorecer la adhesión. Para formar la herida se colocaron insertos de 1 mm de ancho (#CBA-120, Cell-Biolabs) que evitan la adhesión de las células en el centro del pozo. Las células HEK-WT y HEK-Kv10.1 se sembraron a una concentración de 3.75×10^5 células/pozo con un tiempo de incubación de 20-24 h para favorecer la formación de la monocapa, transcurrido este tiempo se sacaron los insertos y se incubaron las células con mitomicina C a $12 \mu\text{M}$ durante 3 h, la mitomicina es un agente alquilante que bloquea la

síntesis de DNA mediante la unión a citocinas y guaninas y su uso en el presente experimento nos permite descartar el componente de replicación involucrado en la migración celular.

Al terminar el periodo de incubación con mitomicina, se adicionaron los tratamientos indicados a continuación y tomando como base el medio específico para cada línea celular: penfluridol 1 μ M, DMSO 0.1%, DMEM-FBS 10%. El tamaño de la herida se evaluó a las 0, 24, y 48 h. El recambio de los tratamientos se realizó cada 24 h.

El cálculo del porcentaje de apertura de la herida se realizó como se muestra a continuación:

$$\% \text{ apertura de la herida}_{24h} = \left(\frac{\text{área } 24h}{\text{área } 0h} \right) * 100$$

$$\% \text{ apertura de la herida}_{48h} = \left(\frac{\text{área } 48h}{\text{área } 0h} \right) * 100$$

5.5. Moléculas

Para el desarrollo del presente proyecto se utilizó penfluridol ($C_{28}H_{27}ClF_5NO$) (P3371-50MG, Sigma Aldrich) cuya solución stock se preparó a 100 μ M en DMSO y se almacenó a -20°C. Las concentraciones ensayadas se diluyeron en solución extracelular normal en un rango de concentración de 0.1-100 μ M. El tiempo de preparación en solución no rebasó los 6 meses para fines experimentales.

5.6. Análisis estadístico y procesamiento de imágenes

Los análisis estadísticos se corrieron en Graph Prisma 9.0, en donde los datos obtenidos se sometieron a pruebas de normalidad de Shapiro Wilks y dependiendo de la distribución de los datos se procedió a realizar las siguientes pruebas estadísticas: Para la comparación de dos grupos con datos no pareados se corrieron pruebas de T de student; para la comparación de dos grupos pareados se corrieron pruebas de T pareadas; para la comparación de proporciones se corrieron pruebas de ANOVA de una vía. Para los datos que no presentaron distribución normal, se corrieron pruebas de Mann Whitney. El efecto fue estadísticamente significativo cuando se obtuvo un valor de $p < 0.05$.

En lo que respecta a las imágenes de microscopía, se analizaron, procesaron y se extrajeron los datos con Fiji: ImageJ versión 1.53.

6. Resultados

6.1. Experimentos de electrofisiología: *Patch-clamp*

A diferencia de los *screenings* masivos previamente realizados mediante técnicas de fluorescencia con el Kit FLIPR que mide cambios en el potencial de membrana, la técnica de *patch-clamp* es considerada una técnica “*gold standard*” para la caracterización de corrientes generadas por la apertura de canales iónicos (Hille, 2001), por lo que nos permite determinar el efecto directo del fármaco sobre la actividad del canal Kv10.1 en tiempo real.

6.1.1. La cinética de las corrientes registradas en las células HEK-Kv10.1 se debe a la actividad del canal Kv10.1

En la figura 7 se pueden apreciar registros representativos obtenidos a través de la aplicación del protocolo IV en las células HEK-WT (7A) y las HEK-Kv10.1 (7B). En la figura 7C se observa la gráfica comparativa de la amplitud de las corrientes con respecto al voltaje (IV) en donde la amplitud de corriente registrada a +50 mV en las células HEK-WT es de 0.12 ± 0.08 nA ($n = 3$) mientras que la de las células HEK-Kv10.1 fue de 8.3 ± 1.8 nA ($n = 3$) por lo que se puede asegurar de que las HEK-Kv10.1 expresan de forma estable y funcional al canal Kv10.1.

6.1.2. El penfluridol inhibe las corrientes del canal Kv10.1

En la figura 8A se aprecia el curso temporal resultante de la aplicación de los pulsos fijos a +50 mV en las células HEK-Kv10.1 en la situación control y en presencia de dos concentraciones de PNFL (1 y 100 μ M). Se observa que el PNFL es capaz de producir una inhibición de las corrientes de manera dosis-dependiente, es decir, existe una mayor inhibición mientras más concentrado estuviera el PNFL; siendo la concentración de 100 μ M en donde se obtuvo una inhibición de $\sim 93\%$ ($n = 4$), así mismo, es pertinente mencionar que la corriente no se recuperó tras la realización del lavado. En la figura 8B se observa la disminución de la corriente en cada una de las condiciones mencionadas de la figura 8A.

En la figura 8C-D se muestran las familias de corrientes en control (8-C) y bajo el efecto de PNFL a 100 μ M (8-D) sobre las corrientes generadas en las células HEK-Kv10.1, en donde se evidencia una fuerte reducción de la amplitud de corriente en presencia del

fármaco. Los puntos anteriormente descritos se pueden apreciar en la gráfica IV (Fig. 8-E), donde se confirma que el PNFL a 100 μM inhibe la actividad de Kv10.1 y no es posible recuperar su actividad mediante lavados.

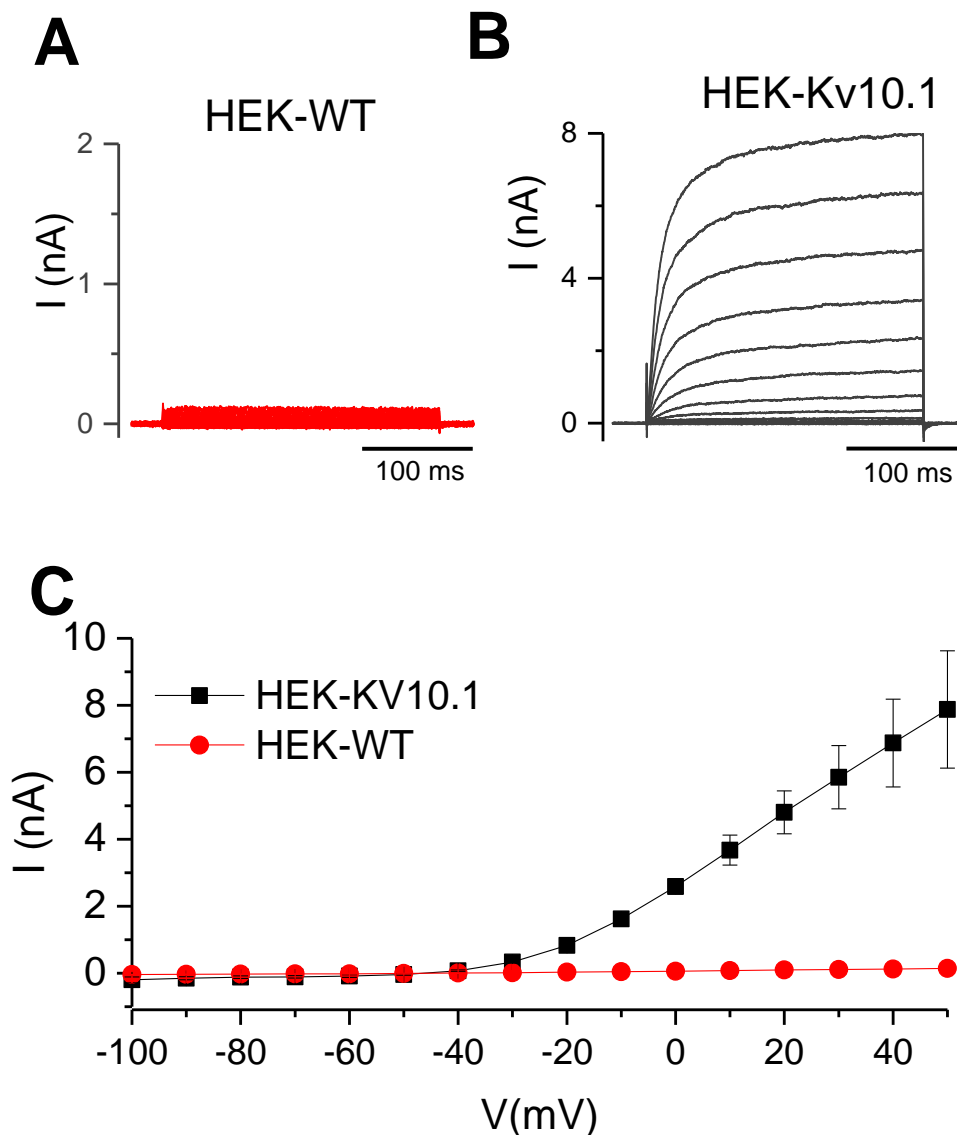


Figura 7 Familia de corriente iónicas en las líneas celulares HEK-WT y HEK-Kv10.1. En A se muestran los trazos de una célula HEK-WT y tal como se puede observar, la amplitud de corriente es casi nula con respecto a la figura B que corresponde a los trazos de un registro de HEK-Kv10.1. En C se muestra la comparación de la amplitud de corriente entre las HEK-WT (rojo; $n = 3$) y las HEK-Kv10.1 (negro; $n = 3$) con respecto al voltaje (IV); los datos representan el promedio \pm el error estándar.

Dado que la respuesta del penfluridol fue dosis-dependiente, se registró el porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones (100 nM, 1 μM , 3 μM , 10 μM , 30 μM y 100 μM) para construir la curva dosis-respuesta mostrada en la figura 9. Con los datos obtenidos, se realizó

un ajuste con la ecuación de Hill en donde se encontró una IC_{50} de $2.7 \pm 0.3 \mu\text{M}$ y un coeficiente de Hill de 0.63 ± 0.03 .

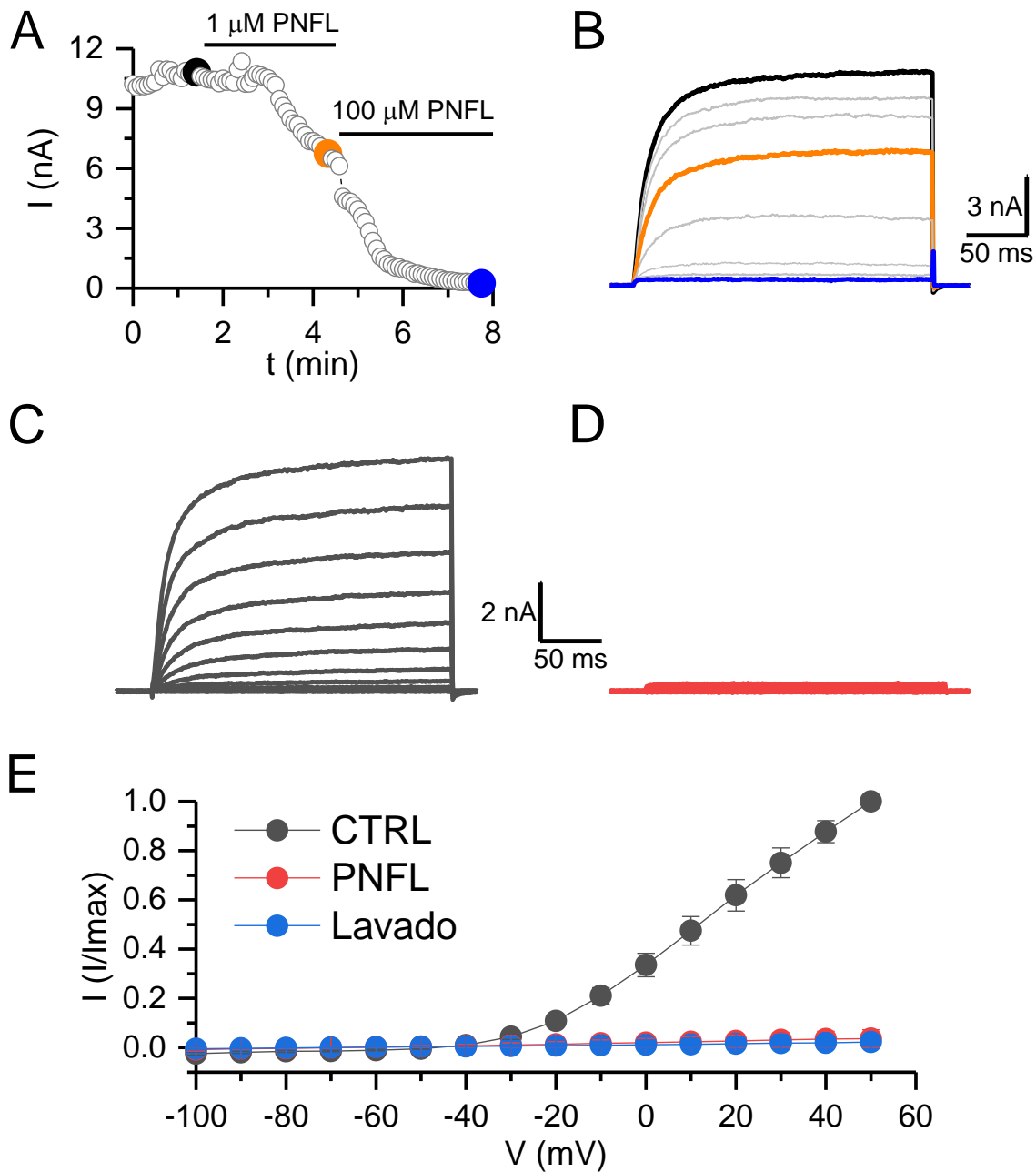


Figura 8 Efecto de PNFL sobre las corrientes generadas por el canal Kv10.1. En A) Se muestra el curso temporal de las corrientes Kv10.1, donde se aprecia la reducción gradual de la corriente tras el inicio de la aplicación de PNFL a $1 \mu\text{M}$ seguido por la aplicación de PNFL a $100 \mu\text{M}$, para finalizar con el lavado. B) Se muestran los trazos resultantes del protocolo de pulso fijo a $+50 \text{ mV}$ a partir de los cuales se graficó el pulso temporal. Los colores corresponden a los tratamientos señalados con los mismos colores que en A. En C y D) se muestran la familia de corrientes Kv10.1 en la situación control y en presencia del fármaco ($100 \mu\text{M}$), respectivamente. E) Gráficas IV de las corrientes normalizadas Kv10.1 en control (negro), en presencia de PNFL $100 \mu\text{M}$ (rojo) y lavado (azul) ($n = 3$ para cada tratamiento); los datos representan el promedio \pm el error estándar.

6.1.3. El efecto inhibitorio del PNFL no se recupera durante el lavado

Como se puede observar en la figura 9 (A-B) el efecto del PNFL sobre las corrientes del canal Kv10.1 es bastante lento de tal manera que el efecto total se estabilizó aproximadamente 10 minutos después de iniciar con el suministro del fármaco, y adicionalmente, no se percibió la recuperación de las corrientes tras hacer un lavado prolongado de alrededor de 5 min con solución extracelular. En la figura C se observan las gráficas resultantes (n = 3) del protocolo IV y nuevamente se confirma lo descrito con anterioridad.

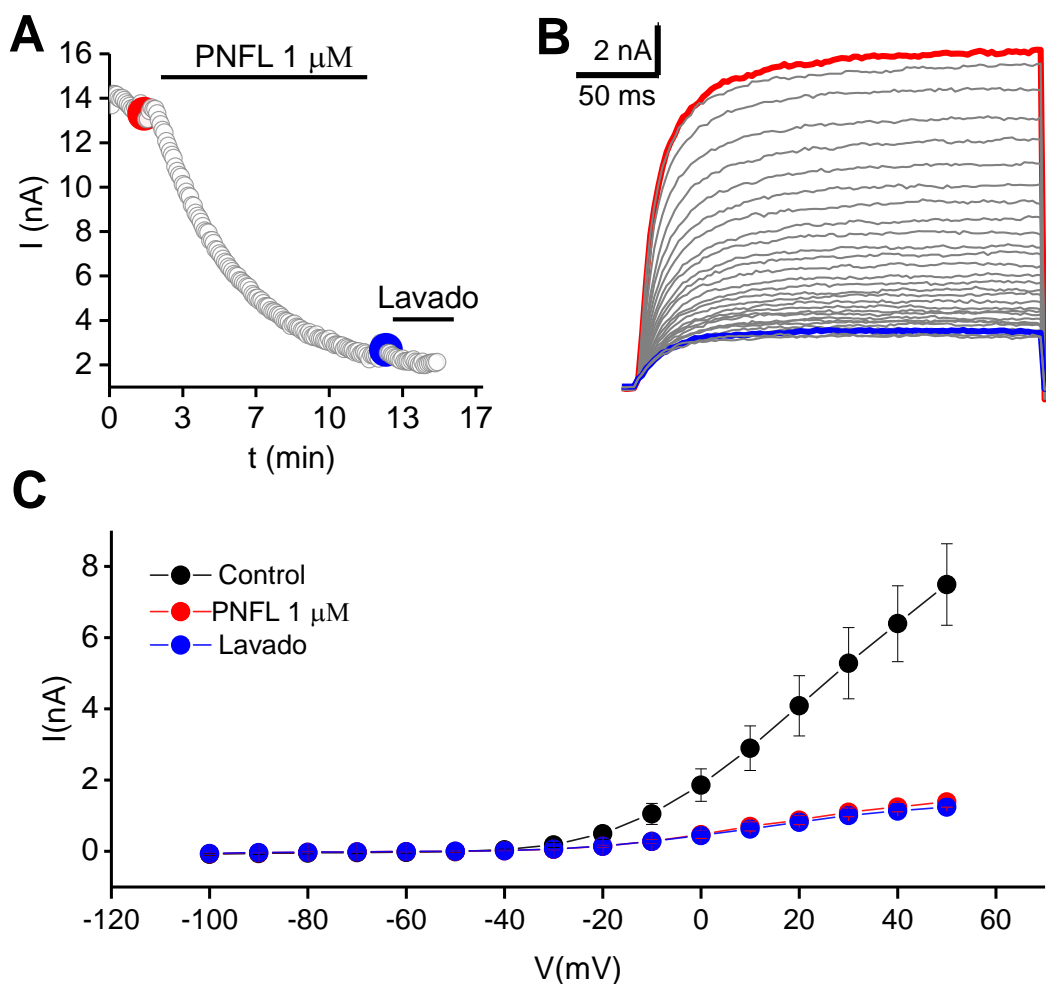


Figura 9 El efecto del PNFL (1 μ M) sobre la corriente de las células HEK-Kv10.1 persiste aún después del lavado. En A se aprecia el curso temporal y cómo disminuye la corriente en un tiempo prolongado de alrededor de 15 min; en B se observan los trazos resultantes del protocolo de pulso fijo a +50 mV, en rojo se muestra el momento de aplicación del PNFL y en azul el lavado; en C se muestran Gráficas IV de las corrientes Kv10.1 en control (rojo), en presencia de PNFL 1 μ M (rojo) y lavado (azul) (n = 3 para cada tratamiento); los datos representan el promedio \pm el error estándar.

6.1.4. Construcción de Curva Dosis-Respuesta

Si bien en la figura 9 se observó que el efecto de PNFL a 1 μM puede resultar bastante potente tras un tiempo de exposición prolongado de 10 minutos, por cuestiones experimentales para la construcción de la curva dosis-respuesta se redujeron los tiempos de registro a 100 s. Este tiempo se definió a partir del tiempo que tarda una concentración saturante de PNFL (100 μM) en llegar a su efecto máximo.

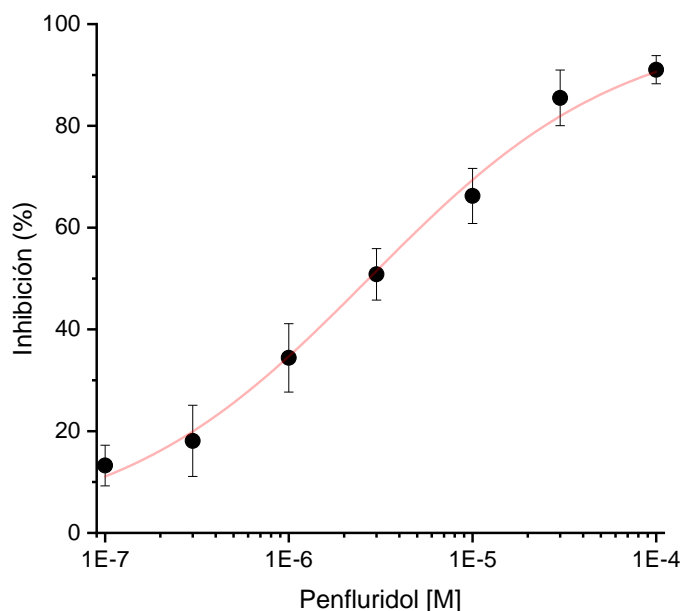


Figura 10 Curva dosis-respuesta del efecto de penfluridol sobre el canal Kv10.1. Cada punto representa una $n \geq 4$ y con un tiempo de respuesta isócrono de 100 s. La línea roja representa el ajuste con la ecuación de Hill. $R^2=0.99583$

6.2. Viabilidad: Marcaje con doble fluorescencia

Los ensayos de viabilidad resultan fundamentales para conocer si las concentraciones bajo las que se prueba el fármaco son citotóxicas dentro de los rangos de tiempo establecidos en los ensayos funcionales, de manera que ayuda a eliminar variables como la muerte celular en los ensayos realizados en la presente investigación.

De acuerdo con la información recabada con los experimentos de *patch-clamp*, los registros electrofisiológicos sugieren que el PNFL tiene efectos potentes sobre la actividad del canal Kv10.1 a concentraciones bajas y con un tiempo de incubación prolongado, por lo que resulta conveniente establecer la concentración de 1 μM como la concentración más alta para ensayos funcionales tales como viabilidad y migración los cuales consideran un tiempo de incubación prolongado que va de 24 a 48 h.

6.2.1. El penfluridol no es citotóxico en HEK-WT ni en HEK-Kv10.1 a 1 μ M

En las figuras 10, 11, 12, y 13 se aprecian las imágenes representativas de los experimentos de viabilidad celular ejecutados por marcaje de doble fluorescencia (Calceína-verde AM y YP), tanto en células HEK-WT como en HEK-Kv10.1, bajo diferentes condiciones experimentales a las 24 y 48 h. En ambas células, las condiciones experimentales incluyeron la situación control, DMSO (0.1%), el control de células muertas fue inducido por la adición de tritón (0.1%), y PNFL (0.01, 0.1 y 1 μ M). Como se puede apreciar en la cuantificación presente en la figura 14, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas al comparar las medias del control con respecto al tratamiento con PNFL a 1 μ M, ni en HEK-WT ni en HEK-Kv10.1 a las 24 h. Pese a que la comparación de medias de control y penfluridol a 1 μ M en HEK-Kv10.1 a las 48 h resultó ser significativa, el efecto sobre la viabilidad fue mínimo.

Durante la ejecución de los ensayos de viabilidad y como se puede observar en las figuras 10-13, se observan cambios en la morfología en las células HEK-Kv10.1 en presencia del penfluridol, por lo que se llevó a cabo el cálculo y análisis de los cambios en el CMC en HEK-WT, así como en HEK-Kv10.1.

HEK-WT 24 h

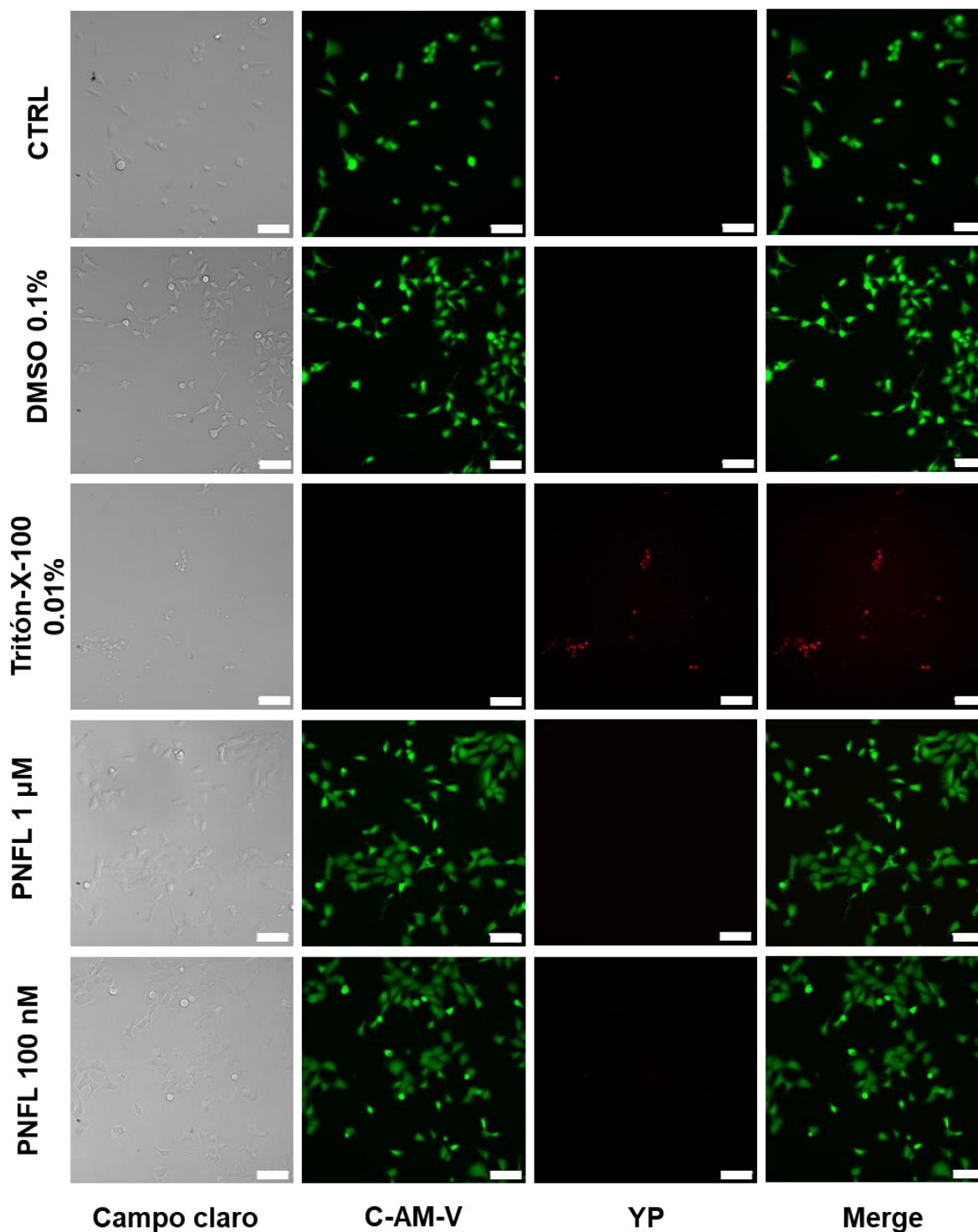


Figura 11 Resultados de ensayo de viabilidad por marcaje con doble fluorescencia en HEK-WT a las 24 h. Las células marcadas en verde (C-AM-V) representan las células vivas y las células marcadas en color rojo (YP) representan las células muertas. Como se puede observar, tanto el control de vivas (CTRL) como el control de muertas (Tritón X-100) presentaron valores acordes con lo establecido y ninguno de los tratamientos con PNFL mostró niveles de citotoxicidad considerables. La barra de escala = 100 μm.

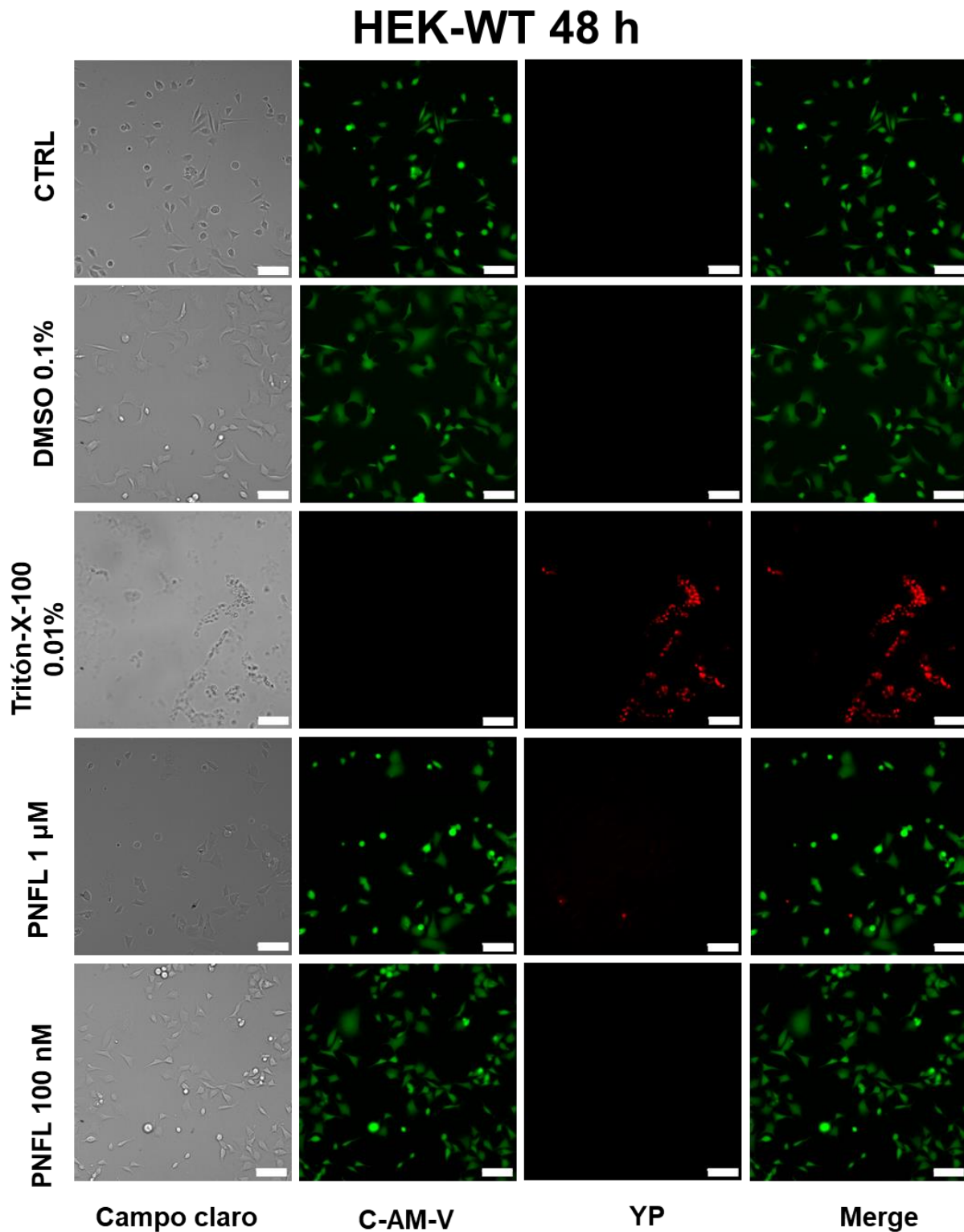


Figura 12 Resultados de ensayo de viabilidad por marcaje con doble fluorescencia en HEK-WT a las 48 h. Las células marcadas en verde (C-AM-V) representan las células vivas y las células marcadas en color rojo (YP) representan las células muertas. Como se puede observar, tanto el control de vivas (CTRL) como el control de muertas (Tritón X-100) presentaron valores acordes con lo establecido y ninguno de los tratamientos con PNFL mostró niveles de citotoxicidad considerables. La barra de escala = 100 μm.

HEK-Kv10.1 24 h

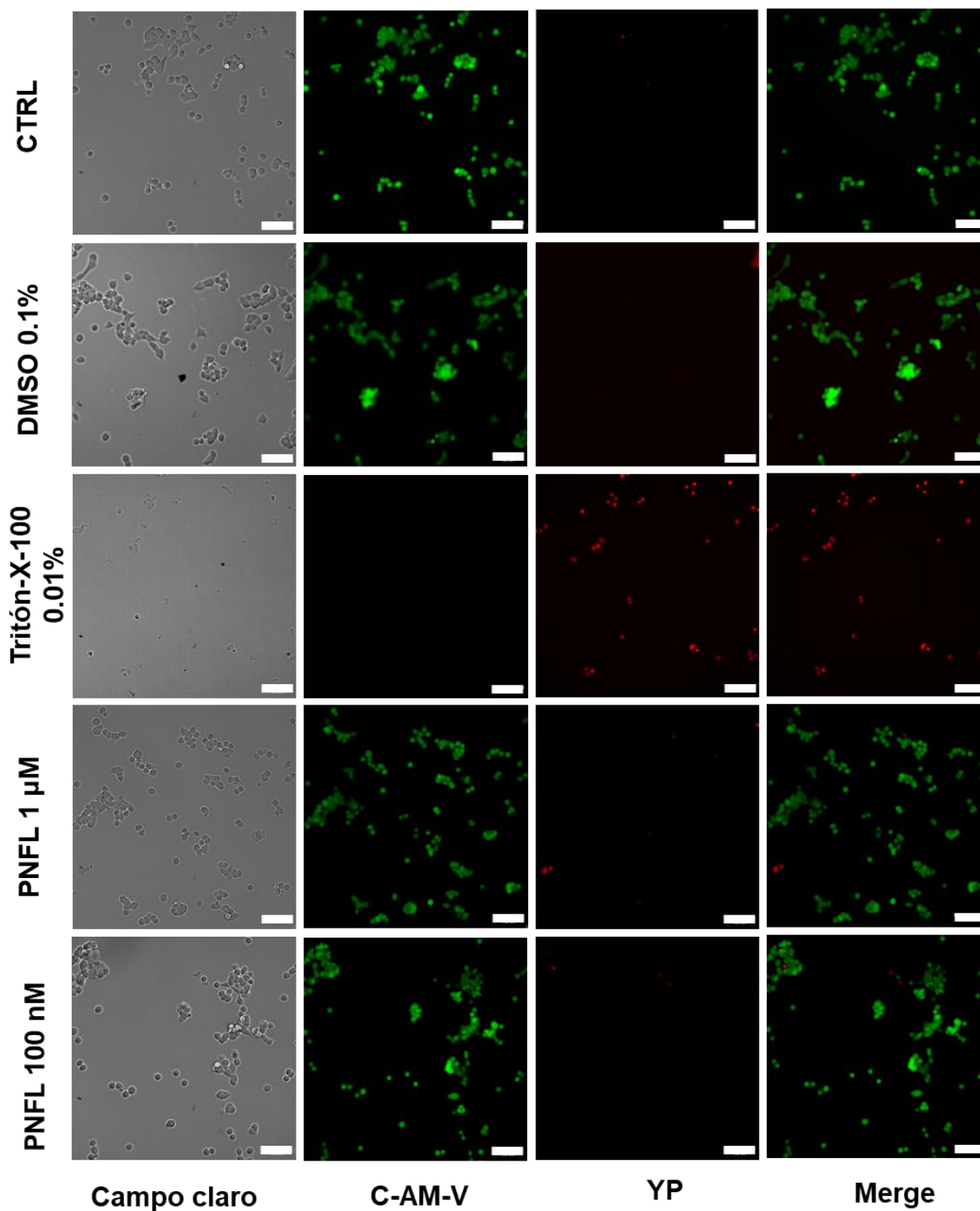


Figura 13 Resultados de ensayo de viabilidad por marcaje con doble fluorescencia en HEK-Kv10.1 a las 24 h. Las células marcadas en verde (C-AM-V) representan las células vivas y las células marcadas en color rojo (YP) representan las células muertas. Tanto el control de vivas (CTRL) como el control de muertas (Tritón X-100) presentaron valores acordes con lo establecido y ninguno de los tratamientos con PNFL mostró niveles de citotoxicidad considerables. La barra de escala = 100 μ m.

HEK-Kv10.1 48 h

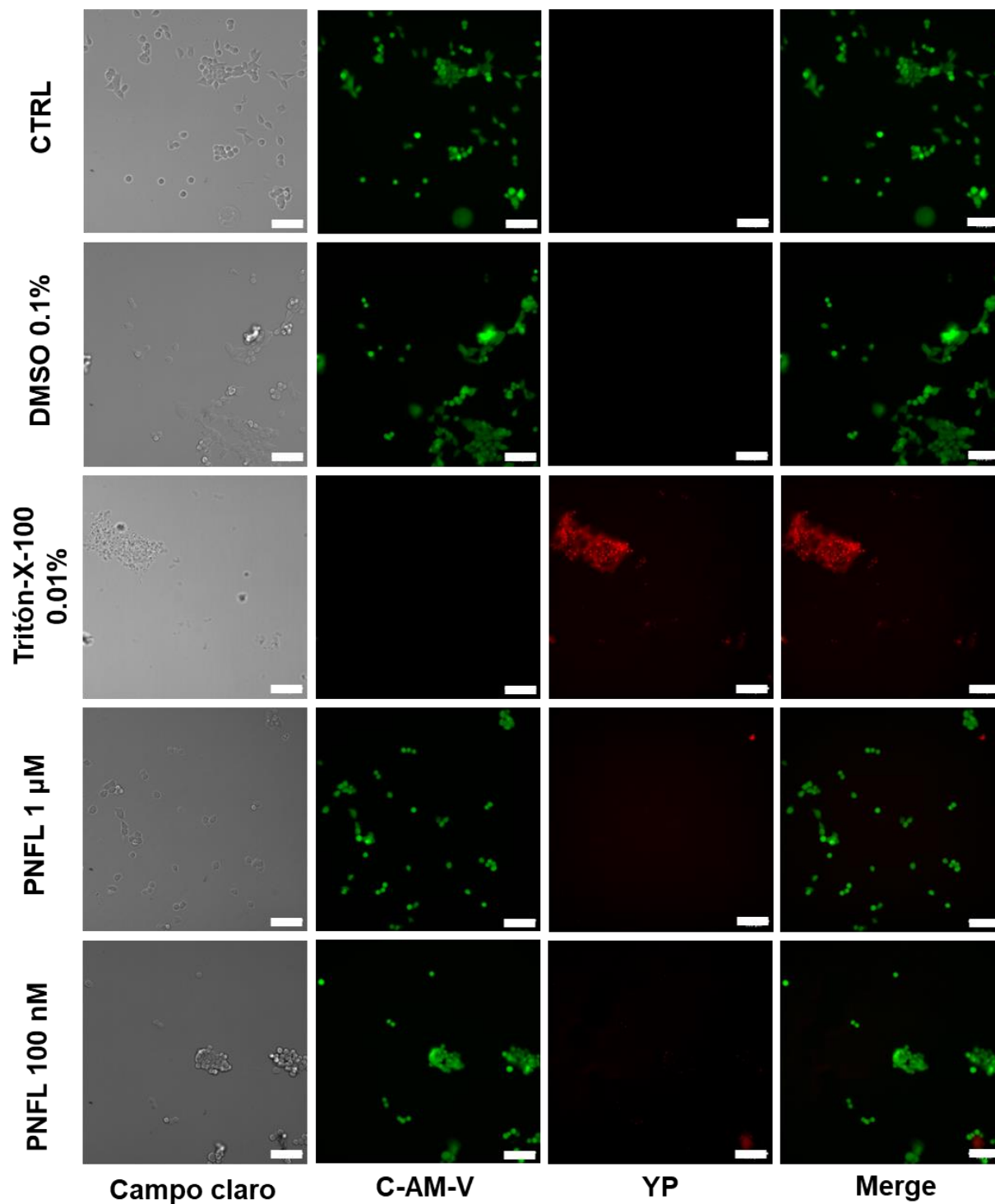


Figura 14 Resultados de ensayo de viabilidad por marcaje con doble fluorescencia en HEK-Kv10.1 a las 48 h. Las células marcadas en verde (C-AM-V) representan las células vivas y las células marcadas en color rojo (YP) representan las células muertas. Como se puede observar, tanto el control de vivas (CTRL) como el control de muertas (Tritón X-100) presentaron valores acordes con lo establecido y ninguno de los tratamientos con PNFL mostró niveles de citotoxicidad considerables. La barra de escala = 100 µm.

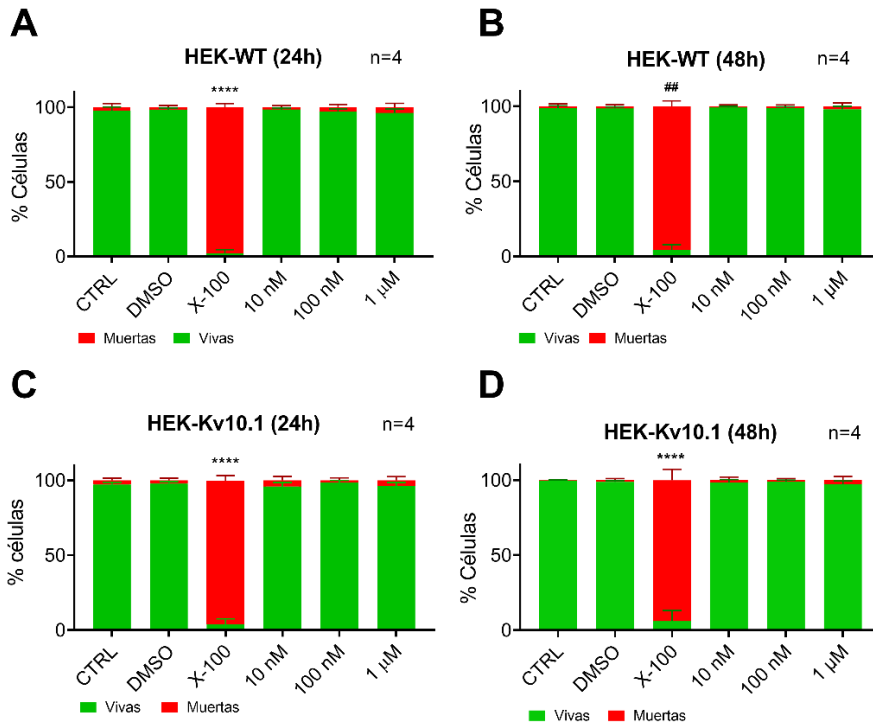


Figura 15 Resultados de la cuantificación de viabilidad celular. Como se puede ver en las figuras sólo se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre CTRL de vivas y X-100 que corresponde al control de muertas, además la viabilidad celular no se afectó por los tratamientos con PNFL. ANOVA de una vía **** $P < 0.0001$, prueba de Kruskal Wallis, comparación múltiple con respecto al control ## $P = 0.0057$.

6.3. El Penfluridol modifica el cociente indicativo de la morfología celular en HEK-Kv10.1 con una respuesta dosis-dependiente.

Los cambios en la morfología celular pueden ser indicadores de la remodelación de componentes estructurales tales como la actina o proteínas de adhesión celular que están estrechamente implicados en procesos celulares y que pueden promover la adquisición de un fenotipo canceroso con mayores tasas de invasividad (Mousavikhamene et al., 2021a). Es por esta razón que se evaluaron las modificaciones en el CMC (eje mayor/eje menor) para cada uno de los tratamientos, en donde las células con un CMC con valores cercanos a 1 corresponden a una forma redondeada, las células con un valor >1 y <3 se aproximan a una forma epitelial y aquellas con un CMC >3 presentan una morfología típica de las células mesenquimales (Rojas-Sanchez et al., 2021).

En la figura 15 al contrastar la morfología de las HEK-WT con las HEK-Kv10.1, se aprecia que el morfotipo las células HEK-Kv10.1 se encuentra más redondeado como consecuencia de la expresión estable del canal. También se puede observar que las células HEK-WT no presentaron cambios en su morfología en presencia del PNFL y que en el caso de las células HEK-Kv10.1 se obtuvo un morfotipo más redondeado en presencia del PNFL, además es posible notar que dicho efecto es consistente a las 24 y 48 h.

En la figura 16, el cálculo y cuantificación del CMC denotan la ausencia de cambios morfológicos en HEK-WT como consecuencia de la exposición a PNFL, mientras que en las HEK-Kv10.1 se observó un desplazamiento significativo del CMC hacia valores cercanos a 1 tanto a las 24 h como a las 48 h de incubación.

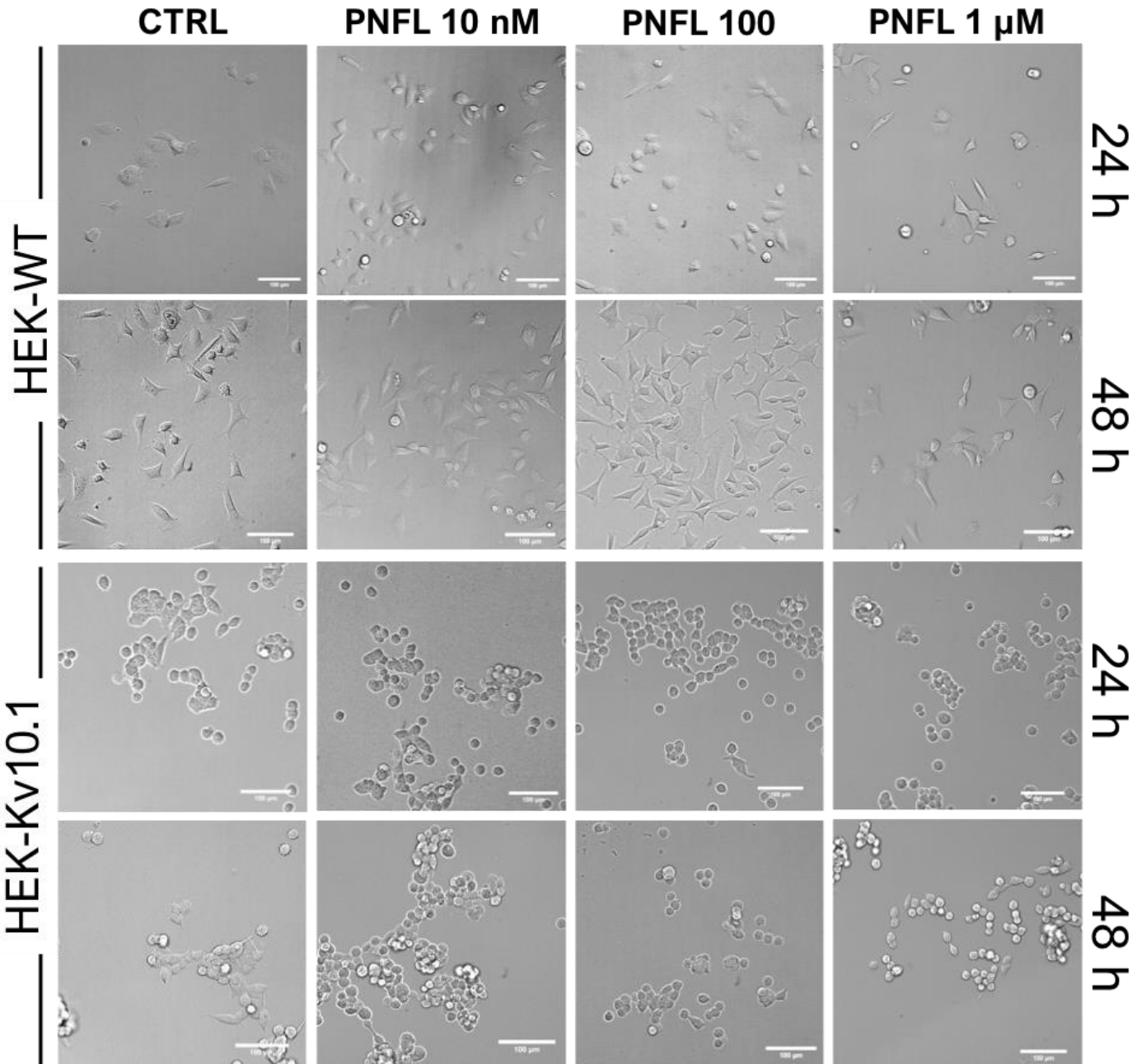


Figura 16 Imágenes de campo claro (40x) y cuantificación del CMC. Se observan que las células HEK-WT no presentaron cambios morfológicos a simple vista en función de los diferentes tratamientos ni a las 24 ni a las 48 h; no obstante, en el caso de HEK-Kv10.1 es posible observar que las células adquirieron una morfología más

redonda conforme aumentó la concentración de PNFL, este efecto se observa a las 24 y 48 h. La línea blanca representa la escala = 100 μM .

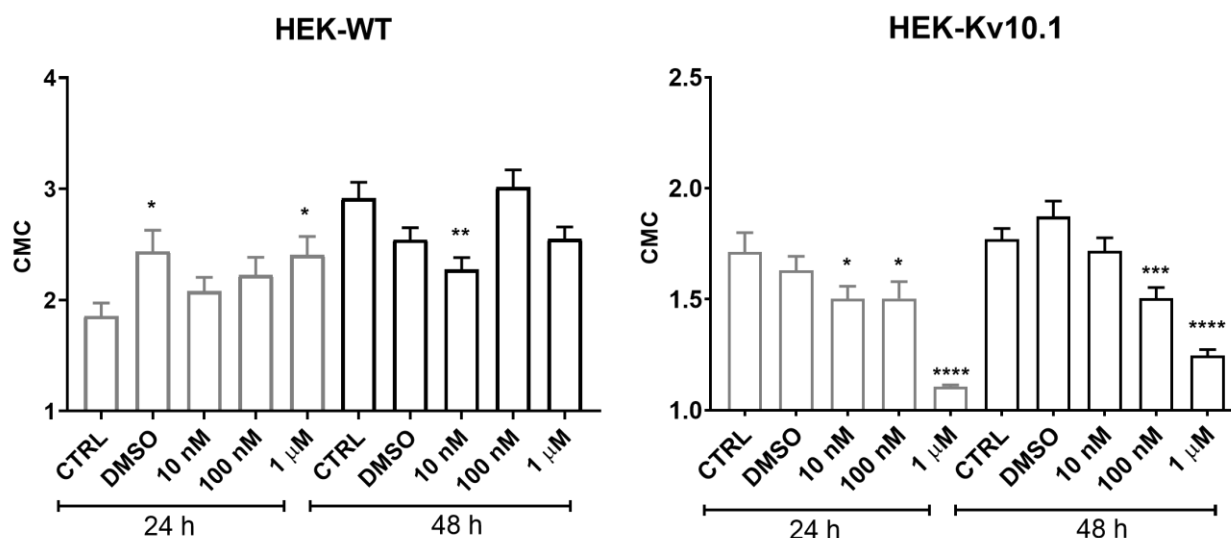


Figura 17 Cuantificación de cambios en el CMC celular en HEK-WT y HEK-Kv10.1. A la izquierda se muestran los cambios morfológicos en las células HEK-WT, las cuales no presentaron modificaciones en función de la concentración de pefluridol. A la derecha, la cuantificación en las células HEK-Kv10.1 muestran de manera consistente que en presencia de PNFL a 1 μM las células modificaron su morfología con respecto al control ($P_{24h,48h} < 0.0001$) así como en 100 nM a las 48h ($P = 0.0007$). ANOVA de una vía con post hoc de Dunnet, comparaciones múltiples con respecto al control, **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$. Los datos representan el promedio \pm el error estándar. La n es de 80 células por condición.

6.4. Migración: Ensayo de la herida

Los procesos de migración en un entorno típico del cáncer se definen a partir dos componentes que contemplan la proliferación descontrolada en conjunto con la migración celular. No obstante, los ensayos de migración realizados tienen por objeto evaluar únicamente la capacidad de migración celular mediante la reducción del área de la herida inicial en un monocapa celular en función de los tratamientos en cuestión.

6.4.1. El Penfluridol reduce la tasa de migración asociada a la expresión del canal Kv10.1

En la figura 17 se muestran las imágenes resultantes de los experimentos de cierre de la herida en las células HEK-WT y se observa que el avance de la migración (marcado con la línea punteada en negro) no presentó diferencias considerables al comparar el control con

el tratamiento de PNFL a 1 μ M, ni el control con DMSO. Mientras que en la figura 19, es posible observar que en el caso de las HEK-Kv10.1 la apertura de la herida se redujo en el tratamiento control a las 48 h.

La cuantificación del porcentaje de apertura de la herida que se muestra en la figura 20 confirma los hallazgos descritos con anterioridad, en donde se muestra que en HEK-WT no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el control y el tratamiento con PNFL ni a las 24 ni a las 48 h; en el caso de las HEK-Kv10.1 se presentaron diferencias significativas ($P < 0.0001$) al comparar el control con PNFL a 1 μ M, en donde el PNFL redujo la tasa de migración en aproximadamente un 24%; y pese a que pareciera que el tratamiento con DMSO (0.1%) alentó ligeramente el cierre de la herida en esta línea celular, no encontraron diferencias significativas al comparar con el tratamiento control ($P_{24h} = 0.3430$, $P_{48h} = 0.1428$) por lo que se descartan alteraciones en la migración por el uso del vehículo y el efecto visto se le puede atribuir meramente al fármaco.

Sin embargo, es importante señalar que dado que se encontró un efecto ligero del PNFL sobre la migración no se presentaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el tratamiento de DMSO con PNFL ni a las 24 h ($P = 0.0774$) ni a las 48 h ($P = 0.0717$).

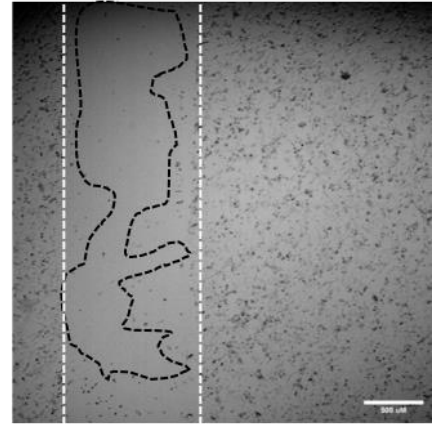
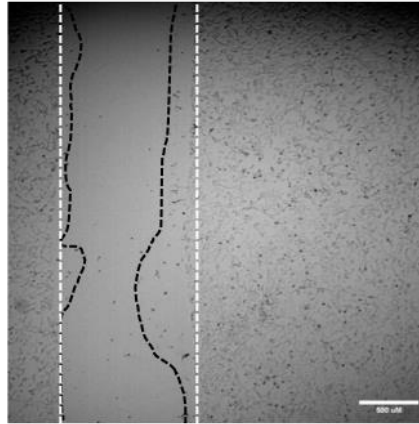
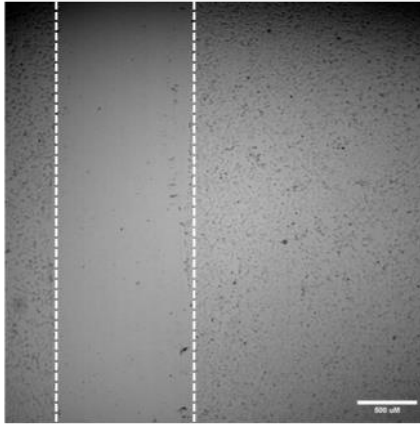
HEK-WT

0 h

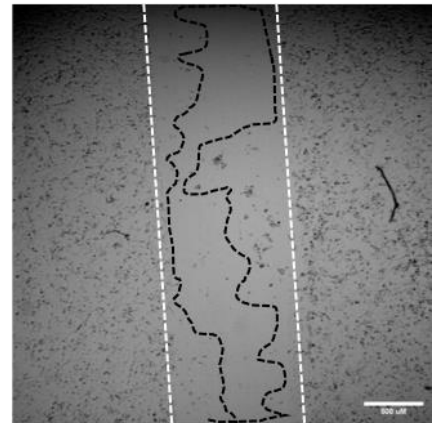
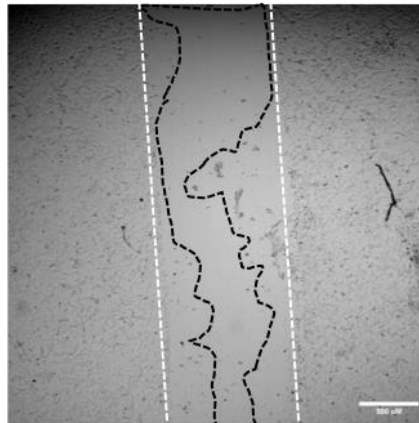
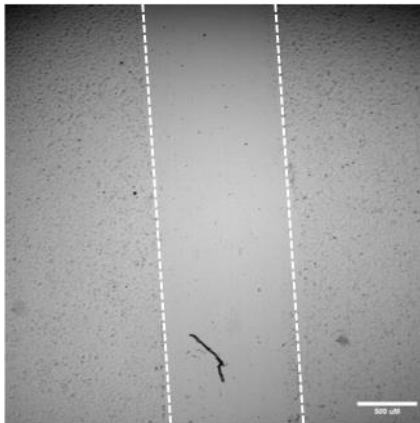
24 h

48 h

Control



DMSO 0.1%



PNFL 1 μM

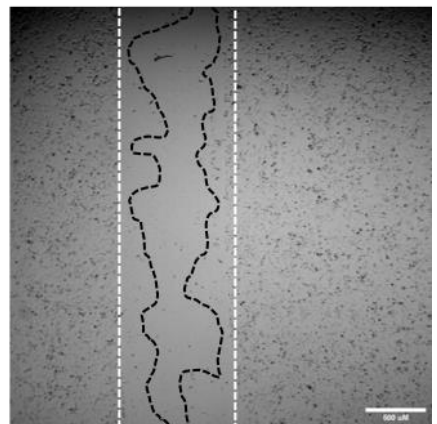
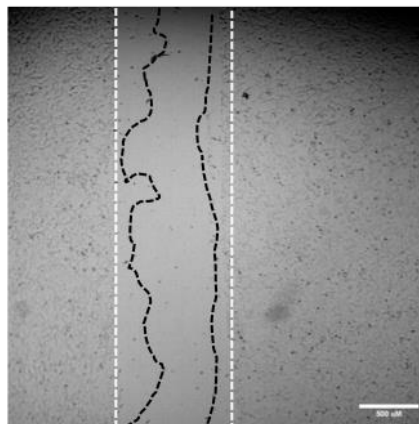
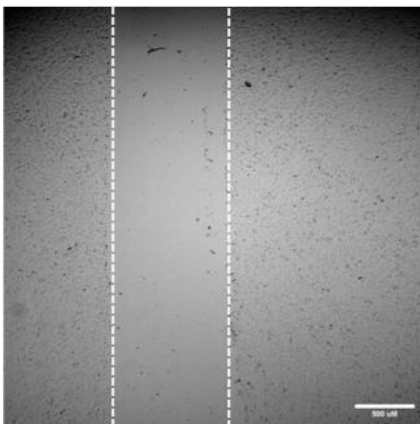


Figura 18 Ensayo de la herida en las células HEK-WT. Imágenes en campo claro (20x). Las líneas puntadas en blanco marcan la herida inicial y las líneas punteadas en color negro indican el avance del cierre de la herida a las 24 y 48 h. Como se puede observar, las células HEK-WT no presentaron diferencias en la tasa de migración en presencia del PNFL a 1 μ M.

HEK-Kv10.1

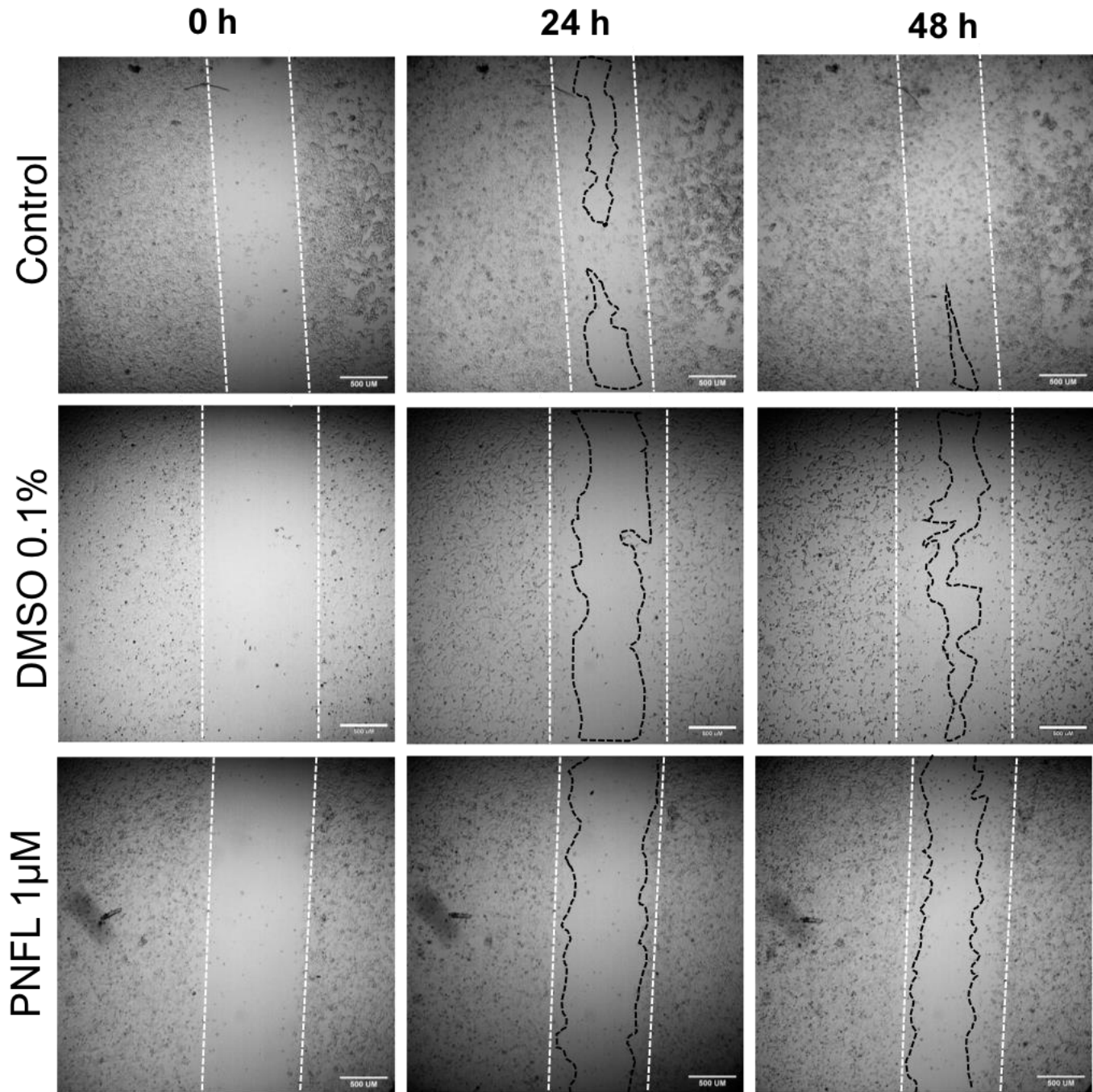


Figura 19 Ensayo de la herida en las células HEK-Kv10.1. Imágenes en campo claro (20x). Las líneas puntadas en blanco marcan la herida inicial y las líneas punteadas en color negro indican el avance del cierre de la herida a las 24 y 48 h. Como se puede observar, las células HEK-Kv10.1 presentaron diferencias en la tasa de migración en presencia del PNFL a 1 μM.

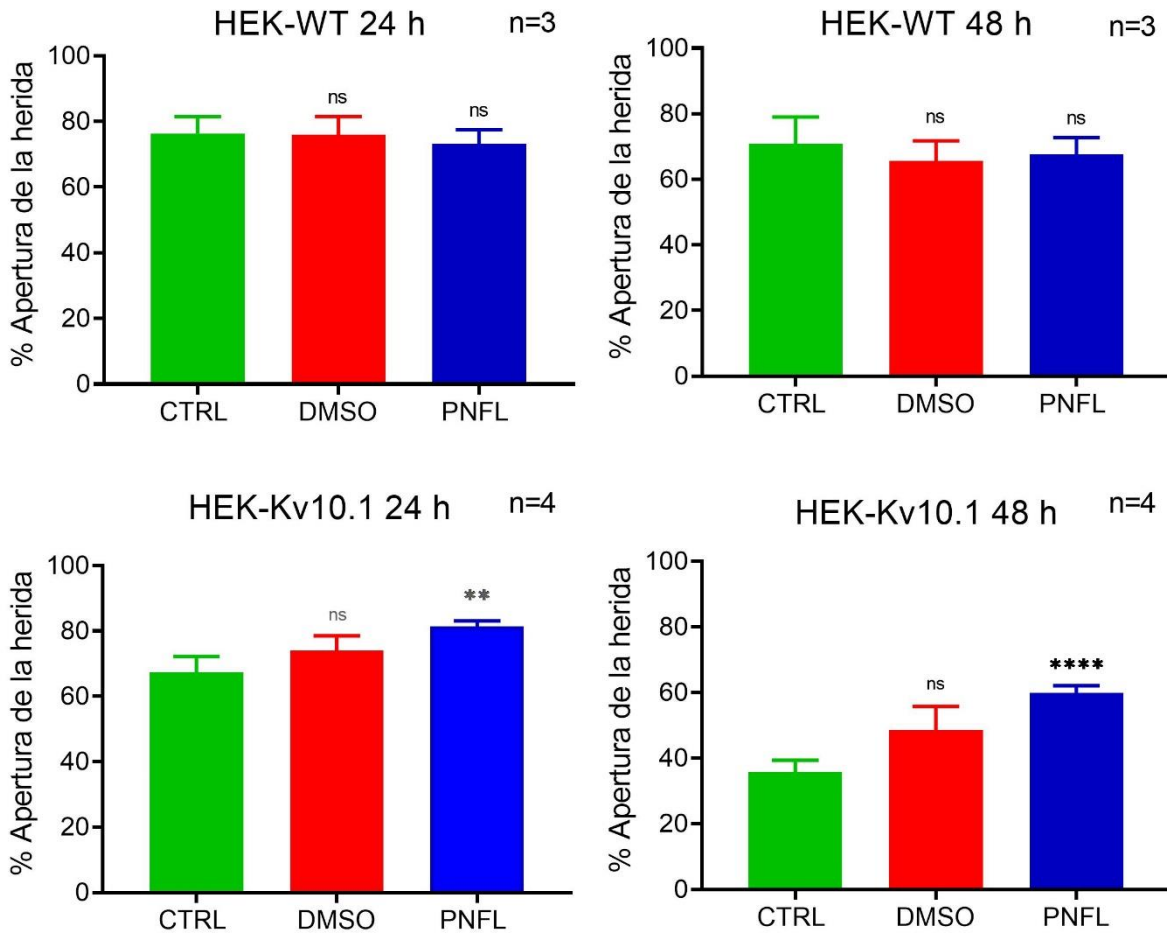


Figura 20 Cuantificación del porcentaje de apertura de la herida. La cuantificación de la apertura de migración indica que la tasa de migración no se ve afectada por PNFL en las células HEK-WT (A, B), pero sí se ve modificada en el caso de las células HEK-Kv10.1 (C, D). Prueba T de student no pareada ** $P < 0.001$, y **** $P < 0.00001$. Los datos representan el promedio \pm el error estándar.

7. Discusión

Anteriormente en el LaNCa, mediante un ensayo de fluorescencia de alto desempeño se identificó al fármaco loperamida y la amitriptilina como inhibidores del canal Kv10.1 (Loza-Huerta et al., 2021), lo que dio pie a continuar con tamizajes primarios mediante técnicas de fluorescencia de alto desempeño. De manera que, se validó la búsqueda de nuevos moduladores de canales iónicos, específicamente del canal Kv10.1 a partir de técnicas de fluorescencia asociadas a cambios en el potencial de membrana. En este tamizaje se dilucidó por primera vez y de manera indirecta el papel inhibitorio del PNFL sobre la actividad del canal Kv10.1 (Gómez-Herrera, 2023).

En el presente proyecto se estudió el efecto inhibitorio del PNFL, un antipsicótico derivado de la difenilbutilpiperidina de primera generación recetado habitualmente para el tratamiento de esquizofrenia, sobre la actividad del canal de potasio activado por voltaje Kv10.1, el cual se encuentra sobre expresado en tejidos cancerosos y cuya actividad promueve la progresión de procesos celulares considerados como *Hallmarks* del cáncer. La inhibición de la corriente se evaluó mediante ensayos de electrofisiología con *patch-clamp*, mientras que el impacto sobre aspectos funcionales se evaluó mediante ensayos de viabilidad y migración llevados a cabo por técnicas de fluorescencia y microscopía respectivamente.

Aunado a esto, numerosos estudios han destacado el efecto antitumoral del PNFL en diferentes tipos de cáncer tales como en cáncer de pulmón (Xue et al., 2020); en cáncer de mama triple negativo (Ranjan et al., 2016); en cáncer de páncreas (Ranjan & Srivastava, 2016); cáncer de vesícula (Hu et al., 2022); entre otros. No obstante, pese a que ya se ha postulado como una potencial quimioterapia, no hay un consenso general que explique por completo la causa de la reducción de masa tumoral, así como el decremento de las tasas de proliferación.

Algunas de las interacciones moleculares del fármaco que ofrecen una explicación al respecto son: la interacción con receptores de dopamina de tipo 2 (DRD2) (Tung et al., 2022); la inhibición de la actividad de canales de Ca^{2+} de tipo T (Tuan & Lee, 2019); la supresión de integrinas de tipo $\alpha 6$, $\beta 4$ (Hwa Soung et al., 2011) y la inhibición de la liberación de factores de crecimiento endotelio-vascular (Srivastava et al., 2020).

Al hacer registros electrofisiológicos, se confirmó que el PNFL inhibe la actividad del Kv10.1 en un modo dosis-dependiente con una IC_{50} de $2.7 \pm 0.3 \mu\text{M}$ en HEK-Kv10.1, la cual podría reducirse aún más al considerar tiempos de registro prolongados de entre 10 y 15 minutos, y en contraste con otros inhibidores reportados por Toplak y colaboradores (2021), la IC_{50} calculada para PNFL se encuentra por debajo de la media de otros inhibidores, por ejemplo: TEA: $28 \pm 13 \text{ mM}$; astemizol: $2.8 \pm 0.1 \mu\text{M}$; imipramida: $40.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$; MK-499: $43.5 \pm 4.7 \mu\text{M}$; dofetilida: $29.6 \pm 1.1 \mu\text{M}$; cisaprida: $11.9 \pm 1.2 \mu\text{M}$; entre otros) lo que permite resaltar la potencia del fármaco como un antagonista del canal Kv10.1.

Como se mencionó con anterioridad, el PNFL también es capaz de inhibir la actividad de otros canales como son los canales de calcio de tipo T ($K_d \approx 72\text{-}110 \text{ nM}$) (Santi et al., 2002a); así mismo, en 2007 se reportó al PNFL como un antagonista in vitro del canal hERG con una IC_{50} de $109.9 \pm 10.3 \text{ nM}$, que además redujo notablemente la unión del hERG con el astemizol en un 102% cuando se probaron ambos compuestos simultáneamente a $10 \mu\text{M}$ (Silvestre & Prous, 2007) lo que indica una posible alta afinidad al filtro selector de K^+ (Asai et al., 2021). Esto último sugiere que la afinidad del PNFL por el dominio formador de poro del canal Kv10.1 podría ser sumamente elevada ya que tanto el canal hERG como el Kv10.1 comparten la composición estructural de dicho dominio y pese a que el PNFL es un antagonista potente del canal hERG, este no se ha retirado del mercado debido a que su administración y vías de distribución disipan el riesgo de desarrollar arritmias cardíacas (Taylor et al., 2021).

Un aspecto de relevancia que se observó en los experimentos de *patch-clamp* fue que el tiempo de respuesta es bastante lento a comparación de otros inhibidores como el astemizol, es decir, para ver el efecto completo del fármaco sobre las corrientes se requieren registros prolongados y, por otro lado, la nula recuperación de la actividad del canal tras realizar lavados de entre 5 y 10 min a parte del hecho de que se trata de un fármaco de alta lipofilicidad ($\log P 7.3$), nos lleva a pensar que probablemente las moléculas de PNFL se internalizan y bloquean el canal en la región intracelular, de manera que el flujo de lavado es incapaz de revertir el efecto.

Hasta el momento sólo se conocen 3 fármacos que actúan como antagonistas del canal desde la región intracelular: tetrandrina y procianidina, que se unen al C-linker (Wang et al., 2019), y la clorpromazina, un antipsicótico de cuarta generación altamente lipofílico con un $\log P$ de 5.2 (NCBI, 2023) que reduce la amplitud de corriente del canal Kv10.1

mediante la unión con el dominio PAS (Wang et al., 2020). Sin embargo, aunque parezca tentador pensar que alguno de estos sitios podría ser el sitio de unión mediante el que actúa el PNFL, no se puede aseverar este hecho hasta hacer docking molecular o bien, resonancia de plasmón de superficie a fin de identificar los sitios de interacción del PNFL con el canal.

En relación a las concentraciones utilizadas en el desarrollo de experimentos funcionales, se utilizó 1 μM como la concentración más alta, la cual es comparable con 52 ng/mL (o bien, 0.1 μM) que corresponde a la concentración en plasma reportada 12 h después de haber suministrado 1.7 mg/kg en clínica (Cooper et al., 1975) y pese a que la concentración utilizada experimentalmente es 10 veces mayor a la reportada, esta se justifica en los tiempos de incubación que fueron relativamente cortos en contraste con la vida media del PNFL (66 h), además de que la misma no rebasa la LD50 de 86.8 mg/kg reportada en ratones (Janssen et al., 1970).

En lo que respecta a los ensayos de viabilidad, se encontró que el PNFL no afectó la viabilidad celular en ambas líneas celulares (HEK-WT y HEK-Kv10.1), de manera que la inhibición de la actividad del canal con PNFL a 1 μM no tuvo efectos citotóxicos. Sin embargo, sí se encontraron cambios morfológicos como consecuencia de la inhibición del canal bajo los efectos del PNFL en HEK-Kv10.1 en donde se identificó un desplazamiento significativo del CMC hacia valores más cercanos a 1 conforme se incrementó la concentración de PNFL, siendo la concentración de 1 μM la que presentó valores de 1.17 ± 0.14 a las 48 h, es decir, adquirieron un morfotipo redondeado en contraste con las células control que presentaron un CMC de 1.8 ± 0.4 y por lo tanto, una morfología más alargada, cabe destacar que este resultado se debe tomar tan sólo como un primer acercamiento a las posibles modificaciones estructurales tras la exposición al PNFL, ya que el CMC de las HEK-Kv10.1 ya se encuentra modificado con la expresión estable del canal.

Las modificaciones en la morfología celular sugieren que las HEK-Kv10.1 perdieron su polaridad al inhibir la actividad del canal Kv10.1 con PNFL. Aunado a esto, en los experimentos de migración, se encontró que el PNFL a 1 μM en las HEK-Kv10.1 redujo en aproximadamente un 24% la tasa de migración tras 48 h de exposición con respecto al control. Por otro lado, no se encontraron diferencias entre el DMSO y el PNFL en esta línea celular debido a que el efecto del PNFL fue menor de lo esperado dado que la concentración que se utilizó fue relativamente baja como para actuar sobre la población total de canales Kv10.1 de un total de 3.75×10^5 células/pozo.

Tomando lo anterior en consideración podríamos pensar que tanto los cambios morfológicos como en la capacidad de migración pueden ser resultado de la participación de elementos estructurales a nivel celular tales como la actina, o proteínas de adhesión celular, las cuales sufren de remodelaciones específicas durante el desarrollo de procesos carcinogénicos y de aquellos asociados a las *Hallmarks del cáncer* cuya actividad se encuentra estrechamente relacionada con la expresión funcional del canal Kv10.1 (Luis et al., 2022).

Un suceso crucial que determina el desarrollo de un fenotipo invasivo es el proceso de transdiferenciación conocido como transición epitelio-mesénquima (EMT por sus siglas en inglés *Epithelium Mesenquimal Transition*). Durante la EMT, las células epiteliales pasan de un estado inmóvil con uniones estrechas entre sí mismas y la matriz extracelular que preserva la polaridad apical-basal a un estado mesenquimal que, de acuerdo con diferentes autores (Fares et al., 2020; Yang et al., 2020), se caracteriza por la adquisición de un fenotipo alargado y parecido al de los fibroblastos: 1) remodelación del citoesqueleto 2) pérdida de la polaridad apical-basal 3) debilitación de adhesión célula-célula 4) remodelación de la adhesión matriz-célula 5) individualización celular 6) establecimiento de polaridad direccional 7) incremento en la capacidad de migración e invasividad.

Desde el punto de vista de EMT y acuerdo con los resultados obtenidos, la inhibición de la actividad del canal Kv10.1 contrarrestó el establecimiento de la polaridad direccional, así como la capacidad de migración. No obstante, se requieren ensayos de marcaje por inmunofluorescencia para confirmar la remodelación del citoesqueleto, así como de proteínas de adhesión celular que ya se han establecido como marcadores para determinar el estado de EMT tales como vimentina (sobre-expresada), fibronectina (sobre-expresada), E-cadherina (suprimida) (Rajasekaran & Rajasekaran, 2009; Ribatti et al., 2020).

Es importante resaltar que la EMT podría no ser el único proceso que explique las modificaciones en el morfotipo de las HEK-Kv10.1 en presencia del PNFL, ya que existen ciertas controversias a cerca de la conceptualización de EMT debido a que no es un proceso sustancial para el desarrollo de procesos metastásicos (Qin et al., 2017) aunado al hecho de que a menudo no se cumplen al pie de la letra las 7 modificaciones descritas con anterioridad en diferentes modelos celulares *in vitro* (Williams et al., 2019). No obstante, con base en los resultados de cambios morfológicos y de los ensayos de migración, el fenotipo de las HEK-Kv10.1 redujo su capacidad migración y esto podría confirmarse al estudiar las

modificaciones en los patrones de distribución de los componentes del citoesqueleto, ya que se ha observado que es posible identificar mediante la remodelación del citoesqueleto, si las células evaluadas presentan un fenotipo canceroso (Mousavikhamene et al., 2021).

En lo que concierne a los trabajos en donde se evidencia al PNFL como un fármaco prometedor en tratamientos contra el cáncer, se ha visto que detiene procesos involucrados en la proliferación sostenida, resistencia a la muerte celular, invasión y metástasis, destrucción de la supresión de la respuesta inmune y la inflamación asociada al desarrollo tumoral; sin embargo, dado el amplio repertorio de los mecanismos de acción reportados, no se ha reportado evidencia de un blanco en específico (Tuan & Lee, 2019), por lo que es pertinente mencionar que el efecto antitumoral del PNFL podría explicarse en cierta medida por su papel inhibitorio de la actividad del canal Kv10.1.

Si bien en el presente trabajo se encontró un elemento importante para explicar uno de los mecanismos de acción del PNFL como un tratamiento contra tipos de cáncer positivos a Kv10.1, aún quedan varias dudas por resolver. Es por esta razón que el trabajo consecuente a este proyecto podría direccionarse hacia la ampliación de experimentos electrofisiológicos y funcionales.

En cuanto al campo de electrofisiología, sería interesante la ejecución de experimentos de competencia con astemizol para determinar si compite con el PNFL de la misma manera que sucedió con el canal hERG en 2007 (Silvestre & Prous, 2007) y de esta forma determinar si el filtro selector de K⁺ corresponde al sitio de unión del fármaco o bien, realizar simulación molecular para probar si podría tener como sitio de unión el dominio PAS o el C-Linker.

En cuestión de ensayos funcionales, se pueden realizar nuevamente ensayos de la herida con una concentración mayor a 1 μ M para alcanzar un punto de saturación no citotóxico del canal en una población celular mayor a la utilizada para registros electrofisiológicos, así como la ejecución de ensayos con insertos *Transwell* para evaluar la invasividad y determinar si es congruente con los resultados de migración obtenidos en el presente trabajo; por otro lado, se sugiere realizar un marcaje por inmunofluorescencia de los componentes del citoesqueleto a fin de determinar si existen modificaciones a causa de la inhibición de la actividad del canal Kv10.1 como consecuencia de la exposición a PNFL.

8. Conclusiones

- Mediante la técnica de *patch-clamp* se observó el efecto inhibitorio del penfluridol sobre las corrientes iónicas del canal Kv10.1. Por lo tanto, se corrobora que los ensayos de fluorescencia que miden cambios en el potencial de membrana ofrecen resultados confiables en la búsqueda de compuestos con actividad sobre el Kv10.1.
- El penfluridol no se lava a bajas concentraciones (1 μM) y se requiere de tiempos prolongados de entre 10 y 15 minutos para observar el efecto total del fármaco sobre la amplitud de corriente.
- El penfluridol ejerce un efecto inhibitorio de forma dosis-dependiente sobre la actividad del canal Kv10.1, con una IC_{50} de $2.7 \pm 0.3 \mu\text{M}$.
- El penfluridol (1 μM) no tiene efectos sobre la viabilidad celular, ni en células HEK-WT ni en células HEK-Kv10.1.
- El penfluridol reduce la migración celular de células con expresión del canal Kv10.1, pero no en células HEK293 silvestres.
- El penflurido produce un desplazamiento del CMC hacia valores indicativos de un morfotipo más redondeado en células HEK-KV10.1, pero no en las HEK-WT.

SIGLAS

<i>C-AM-V</i>	Calceína-AM-verde
<i>CMC</i>	Cociente Indicativo de la morfología celular
<i>EMT</i>	Por sus siglas en inglés <i>Epithelium Mesenchymal Transition</i>
<i>HEK-Kv10.1</i>	Por sus siglas en inglés <i>Human Embryonic Kidney</i> . Línea celular HEK293 con expresión del canal Kv10.1 de humano.
<i>HEK-WT</i>	Por sus siglas en inglés <i>Human Embryonic Kidney</i> . Línea celular HEK293 silvestre
<i>HIF-1α</i>	Por sus siglas en inglés <i>Hipoxia Inducible Factor-1α</i>
<i>MAPs</i>	Por sus siglas en inglés <i>Microtubule Associate Proteins</i>
<i>MCF7</i>	Por sus siglas en inglés <i>Michigan Cancer Foundation</i> . Línea celular de cáncer de mama.
<i>PNFL</i>	Penfluridol
<i>PMR</i>	Potencial de membrana en reposo
<i>SFB</i>	Suero Fetal Bovino
<i>VEGF</i>	Por sus siglas en inglés <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
<i>DP</i>	Dominio formador de Poro
<i>DSV</i>	Dominio Sensor de Voltaje
<i>YP</i>	Yoduro de propidio

9. Referencias

- Aidley David J., & Standfield Peter R. (1996). Ion channels molecules in action. In 1996.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2016). *Molecular Biology of the Cell* (6th ed., Vol. 4, Issue 1). Garland Science: Taylor & Francis Group.
- Asai, T., Adachi, N., Moriya, T., Oki, H., Maru, T., Kawasaki, M., Suzuki, K., Chen, S., Ishii, R., Yonemori, K., Igaki, S., Yasuda, S., Ogasawara, S., Senda, T., & Murata, T. (2021). Cryo-EM Structure of K⁺-Bound hERG Channel Complexed with the Blocker Astemizole. *Structure*, 29(3), 203-212.e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2020.12.007>
- Bauer, C. K., & Schwarz, J. R. (2001). Physiology of EAG K⁺ channels. In *Journal of Membrane Biology* (Vol. 182, Issue 1, pp. 1–15). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/s00232-001-0031-3>
- Boldrini-França, J., Pinheiro-Junior, E. L., Peigneur, S., Pucca, M. B., Cerni, F. A., Borges, R. J., Costa, T. R., Carone, S. E. I., Fontes, M. R. de M., Sampaio, S. V., Arantes, E. C., & Tytgat, J. (2020). Beyond hemostasis: a snake venom serine protease with potassium channel blocking and potential antitumor activities. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61258-x>
- Carvalho, J. (2021). A bioelectric model of carcinogenesis, including propagation of cell membrane depolarization and reversal therapies. *Scientific Reports*, 11(1), 13607. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92951-0>
- Chen, Y., Sánchez, A., Rubio, M. E., Kohl, T., Pardo, L. A., & Stühmer, W. (2011). Functional kv10.1 channels localize to the inner nuclear membrane. *PLoS ONE*, 6(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019257>
- Claghorn, J. L., Mathew, R. J., & Mirabi, M. (1979). Penfluridol: a long-acting oral antipsychotic drug. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 40(2), 107–109.
- Cooper, S. F., Dugal, R., Albert, J.-M., & Bertrand, M. (1975). Penfluridol steady-state kinetics in psychiatric patients. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 18(3), 325–329. <https://doi.org/10.1002/cpt1975183325>
- 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>

- Dziegielewska, B., Gray, L. S., & Dziegielewski, J. (2014). T-type calcium channels blockers as new tools in cancer therapies. In *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* (Vol. 466, Issue 4, pp. 801–810). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1444-z>
- Fairless, R., Beck, A., Kravchenko, M., Williams, S. K., Wissenbach, U., Diem, R., & Cavalié, A. (2013). Membrane Potential Measurements of Isolated Neurons Using a Voltage-Sensitive Dye. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058260>
- Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., & Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 5, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>
- Felipe, A., Vicente, R., Villalonga, N., Roura-Ferrer, M., Martínez-Mármol, R., Solé, L., Ferreres, J. C., & Condom, E. (2006). Potassium channels: new targets in cancer therapy. *Cancer Detection and Prevention*, 30(4), 375–385. <https://doi.org/10.1016/j.cdp.2006.06.002>
- Fermini, B. (2008). Topics in Medicinal Chemistry. In B. Fermini & B. T. Priest (Eds.), *Recent Advances in Ion Channel Screening Technologies* (Vol. 3, pp. 2–17). <https://doi.org/10.1007/978-3-540-79729-6>
- Gómez-Herrera, M. A. (2023). *Estudios de fluorescencia para la búsqueda de compuestos con actividad sobre el canal oncogénico de K⁺ Kv10.1* [Tesis de licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 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>
- Gutiérrez García, E. (2022). *Activación del canal oncogénico de K⁺ Kv10.1 : papel sobre la proliferación, migración y viabilidad de células con propiedades tumorales*. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Fisiología Celular.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100, 57–70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hartung, F., Krüwel, T., Shi, X., Pfizenmaier, K., Kontermann, R., Chames, P., Alves, F., & Pardo, L. A. (2020). A Novel Anti-Kv10.1 Nanobody Fused to Single-Chain TRAIL Enhances

Apoptosis Induction in Cancer Cells. *Frontiers in Pharmacology*, 11.

<https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00686>

Hartung, F., Stühmer, W., & Pardo, L. A. (2011). Tumor cell-selective apoptosis induction through targeting of KV10.1 via bifunctional TRAIL antibody. *Molecular Cancer*, 10.

<https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-109>

Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., & Mackinnon, R. (1994). Mutations in the K⁺ Channel Signature Sequence. *Biophysical Journal*, 66, 1061–1067.

Hemmerlein, B., Weseloh, R. M., de Queiroz, F. M., 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, 1–13.

<https://doi.org/10.1186/1476-4598-5-41>

Herrmann, S., Ninkovic, M., Kohl, T., Lörinczi, É., & Pardo, L. A. (2012). Cortactin controls surface expression of the voltage-gated potassium channel KV10.1. *Journal of Biological Chemistry*,

287(53), 44151–44163. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.372540>

Hille, B. (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes* (3 rd). Sinauer Associates, Inc .

Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiology*, 117, 500–544.

Hu, J., Cao, J., Jin, R., Zhang, B., Topatana, W., Juengpanich, S., Li, S., Chen, T., Lu, Z., Cai, X., & Chen, M. (2022). Inhibition of AMPK/PFKFB3 mediated glycolysis synergizes with penfluridol to suppress gallbladder cancer growth. *Cell Communication and Signaling*, 20(1).

<https://doi.org/10.1186/s12964-022-00882-8>

Hwa Soung, Y., Jin Gil, H., Clifford, J. L., & Chung, J. (2011). *Role of 64 Integrin in Cell Motility, Invasion and Metastasis of Mammary Tumors*.

Janssen, P. A. J., Niemegeers, C. J. E., Schellekens, K. H. L., Lenaerts, F. M., Verbruggen, F. J., Van Nueten, J. M., Schaper, W. K. A., Janssen, P. A. J., Niemegeers, C. J. E., Schellekens, K. H. L., Lenaerts, F. M., Verbruggen, F. J., Van Nueten, J. M., & Schaper, W. K. A. (1970). The pharmacology of penflundol (R 16341), a new potent and orally long-acting neuroleptic drug. In *EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY* (Vol. 11).

Kaplan, W. D., & Trout, W. E. (1969). THE BEHAVIOR OF FOUR NEUROLOGICAL MUTANTS OF DROSOPHILA. *Genetics*, 61, 399–409.

Kasahara, K., & Inagaki, M. (2021). Primary ciliary signaling: links with the cell cycle. *Trends in Cell Biology*, 31(12), 954–964. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.07.009>

- Kuang, Q., Purhonen, P., & Hebert, H. (2015). Structure of potassium channels. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 72, Issue 19, pp. 3677–3693). Birkhauser Verlag AG.
<https://doi.org/10.1007/s00018-015-1948-5>
- Kuo, M. M. C., Haynes, W. J., Loukin, S. H., Kung, C., & Saimi, Y. (2005). Prokaryotic K⁺ channels: From crystal structures to diversity. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(5), 961–985.
<https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.03.003>
- Lee, Y. C., & Wolff, J. (1982). Two opposing effects of calmodulin on microtubule assembly depend on the presence of microtubule-associated proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 257(11), 6306–6310. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(20\)65140-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(20)65140-7)
- Levin, M., & Stevenson, C. G. (2012). Regulation of cell behavior and tissue patterning by bioelectrical signals: Challenges and opportunities for biomedical engineering. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 14, 295–323. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071811-150114>
- Lewis, R. J., & Garcia, M. L. (2003). Therapeutic potential of venom peptides. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 2, Issue 10, pp. 790–802). European Association for Cardio-Thoracic Surgery. <https://doi.org/10.1038/nrd1197>
- Loza-Huerta, A., Milo, E., Picones, A., Hernández-Cruz, A., & Luis, E. (2021). Thallium-sensitive fluorescent assay reveals loperamide as a new inhibitor of the potassium channel Kv10.1. *Pharmacological Reports*, 73(6), 1744–1753. <https://doi.org/10.1007/s43440-021-00304-5>
- Luis, E., Anaya-Hernández, A., León-Sánchez, P., & Durán-Pastén, M. L. (2022). The Kv10 . 1 Channel : A Promising Target in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences Review*, 23, 8458, 1–20. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms23158458>
- 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>
- Marino, A. A., Iliev, I. G., Schwalke, M. A., Gonzalez, E., Marler, K. C., & Flanagan, C. A. (1994). Association between Cell Membrane Potential and Breast Cancer. *Tumor Biology*, 15(2), 82–89.
<https://doi.org/10.1159/000217878>
- Martin, S., Lino de Oliveira, C., Mello de Queiroz, F., Pardo, L. A., Stühmer, W., & Del Bel, E. (2008). Eag1 potassium channel immunohistochemistry in the CNS of adult rat and selected

regions of human brain. *Neuroscience*, 155(3), 833–844.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.05.019>

- Martínez, R., Stühmer, W., Martin, S., Schell, J., Reichmann, A., Rohde, V., & Pardo, L. (2015). *Analysis of the expression of Kv10.1 potassium channel in patients with brain metastases and glioblastoma multiforme: impact on survival*. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1848-y>
- Moreels, L., Peigneur, S., Galan, D. T., De Pauw, E., Béress, L., Waelkens, E., Pardo, L. A., Quinton, L. C., & Tytgat, J. (2017). APETx4, a novel sea anemone toxin and a modulator of the cancer-relevant potassium channel KV10.1. *Marine Drugs*, 15(9). <https://doi.org/10.3390/md15090287>
- Mousavikhamene, Z., Sykora, D. J., Mrksich, M., & Bagheri, N. (2021a). Morphological features of single cells enable accurate automated classification of cancer from non-cancer cell lines. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03813-8>
- Mousavikhamene, Z., Sykora, D. J., Mrksich, M., & Bagheri, N. (2021b). Morphological features of single cells enable accurate automated classification of cancer from non-cancer cell lines. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03813-8>
- Movsisyan, N., & Pardo, L. (2020a). Kv10.1 Regulates Microtubule Dynamics during Mitosis. *Cancers*, 12, 2409. <https://doi.org/10.3390/cancers12092409>
- Movsisyan, N., & Pardo, L. A. (2020b). Kv10.1 regulates microtubule dynamics during mitosis. *Cancers*, 12(9), 1–26. <https://doi.org/10.3390/cancers12092409>
- Napoli, G., Panzironi, N., Traversa, A., Catalanotto, C., Pace, V., Petrizzelli, F., Giovannetti, A., Lazzari, S., Cogoni, C., Tartaglia, M., Carella, M., Mazza, T., Pizzuti, A., Parisi, C., & Caputo, V. (2022). Potassium Channel KCNH1 Activating Variants Cause Altered Functional and Morphological Ciliogenesis. *Molecular Neurobiology*, 59(8), 4825–4838. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02886-4>
- National Cancer Institute. (2022, October 11). *What is cancer?* <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.
- National Center for Biotechnology Information. (2023a, July 22). *PubChem Compound Summary for CID 33630, Penfluridol*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Penfluridol>.
- National Center for Biotechnology Information. (2023b, September 27). *PubChem Compound Summary for CID 2726, Chlorpromazine*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorpromazine>.

- Nishimura, Y., Yamakawa, D., Shiromizu, T., & Inagaki, M. (2021). Aurora a and akt kinase signaling associated with primary cilia. In *Cells* (Vol. 10, Issue 12). MDPI.
<https://doi.org/10.3390/cells10123602>
- 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)
- 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>
- Pardo, L. A., Brüggemann, A., Camacho, J., & Stühmer, W. (1998). Cell cycle-related changes in the conducting properties of r-eag K⁺ channels. *Journal of Cell Biology*, *143*(3), 767–775.
<https://doi.org/10.1083/jcb.143.3.767>
- Pardo, L. A., Del Camino, D., Sánchez, A., Alves, F., Brüggemann, A., Beckh, S., & Stühmer, W. (1999). Oncogenic potential of EAG K⁺ channels. *EMBO Journal*, *18*(20), 5540–5547.
<https://doi.org/10.1093/emboj/18.20.5540>
- Peretti, M., Badaoui, M., Girault, A., van Gulick, L., Mabile, M. P., Tebbakha, R., Sevestre, H., Morjani, H., & Ouadid-Ahidouch, H. (2019). Original association of ion transporters mediates the ECM-induced breast cancer cell survival: Kv10.1-Orai1-SPCA2 partnership. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37602-7>
- 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>
- Priest, B. T., Bell, I. M., & Garcia, M. L. (2008). Role of hERG potassium channel assays in drug development. In *Channels* (Vol. 2, Issue 2, pp. 87–93). Taylor and Francis Inc.
<https://doi.org/10.4161/chan.2.2.6004>
- Qin, J. H., Wang, L., Li, Q. L., Liang, Y., Ke, Z. Y., & Wang, R. A. (2017). Epithelial-mesenchymal transition as strategic microenvironment mimicry for cancer cell survival and immune escape? *Genes and Diseases*, *4*(1), 16–18. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2016.10.001>
- Rajasekaran, A. K., & Rajasekaran, S. A. (2009). Epithelial-to-Mesenchymal Transition. In M. Schwab (Ed.), *Encyclopedia of Cancer* (pp. 1024–1027). Springer Berlin Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/978-3-540-47648-1_1962

- Ranjan, A., Gupta, P., & Srivastava, S. K. (2016). Penfluridol: An antipsychotic agent suppresses metastatic tumor growth in triple-negative breast cancer by inhibiting integrin signaling axis. *Cancer Research*, 76(4), 877–890. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1233>
- Ranjan, A., & Srivastava, S. K. (2016). Penfluridol suppresses pancreatic tumor growth by autophagy-mediated apoptosis. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep26165>
- Ribatti, D., Tamma, R., & Annese, T. (2020). Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. In *Translational Oncology* (Vol. 13, Issue 6). Neoplasia Press, Inc. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100773>
- Rojas-Sanchez, G., García-Miranda, A., Montes-Alvarado, J. B., Cotzomi-Ortega, I., Sarmiento-Salinas, F. L., Jimenez-Ignacio, E. E., Ramírez-Ramírez, D., Romo-Rodríguez, R. E., Reyes-Leyva, J., Vallejo-Ruiz, V., Pazos-Salazar, N. G., & Maycotte, P. (2021). Chloroquine Induces ROS-mediated Macrophage Migration Inhibitory Factor Secretion and Epithelial to Mesenchymal Transition in ER-positive Breast Cancer Cell Lines. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 26(4), 341–355. <https://doi.org/10.1007/s10911-021-09503-5>
- Sánchez, A., Urrego, D., & Pardo, L. A. (2016). Cyclic expression of the voltage-gated potassium channel K V 10.1 promotes disassembly of the primary cilium . *EMBO Reports*, 17(5), 708–723. <https://doi.org/10.15252/embr.201541082>
- Santi, C. M., Cayabyab, F. S., Sutton, K. G., Mcrory, J. E., Mezeyova, J., Hamming, K. S., Parker, D., Stea, A., & Snutch, T. P. (2002a). *Differential Inhibition of T-Type Calcium Channels by Neuroleptics*.
- Santi, C. M., Cayabyab, F. S., Sutton, K. G., Mcrory, J. E., Mezeyova, J., Hamming, K. S., Parker, D., Stea, A., & Snutch, T. P. (2002b). *Differential Inhibition of T-Type Calcium Channels by Neuroleptics*.
- Silvestre, J. S., & Prous, J. R. (2007). Comparative evaluation of hERG potassium channel blockade by antipsychotics. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 29(7), 457–465. <https://doi.org/10.1358/mf.2007.29.7.1119172>
- Srivastava, S., Zahra, F. T., Gupta, N., Tullar, P. E., Srivastava, S. K., & Mikelis, C. M. (2020). Low dose of penfluridol inhibits VEGF-induced angiogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms21030755>
- Taylor, D. M., Barnes, T. R. E., & Young, A. H. (2021). Schizophrenia and Related Psychoses. In *The Maudsley Prescribing Guidelines in Psychiatry* (pp. 1–224). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119870203.mpg001>

- Toplak, Ž., Hendrickx, L. A., Abdelaziz, R., Shi, X., Peigneur, S., Tomašič, T., Tytgat, J., Peterlin-Mašič, L., & Pardo, L. A. (2021). Overcoming challenges of HERG potassium channel liability through rational design: Eag1 inhibitors for cancer treatment. *Medicinal Research Reviews*, 42(1), 183–226. <https://doi.org/10.1002/med.21808>
- Toplak, Ž., Hendrickx, L. A., Abdelaziz, R., Shi, X., Peigneur, S., Tomašič, T., Tytgat, J., Peterlin-Mašič, L., & Pardo, L. A. (2022). Overcoming challenges of HERG potassium channel liability through rational design: Eag1 inhibitors for cancer treatment. In *Medicinal Research Reviews* (Vol. 42, Issue 1, pp. 183–226). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/med.21808>
- Tuan, N. M., & Lee, C. H. (2019). Penfluridol as a candidate of drug repurposing for anticancer agent. *Molecules*, 24(20). <https://doi.org/10.3390/molecules24203659>
- Tung, M. C., Lin, Y. W., Lee, W. J., Wen, Y. C., Liu, Y. C., Chen, J. Q., Hsiao, M., Yang, Y. C., & Chien, M. H. (2022). Targeting DRD2 by the antipsychotic drug, penfluridol, retards growth of renal cell carcinoma via inducing stemness inhibition and autophagy-mediated apoptosis. *Cell Death and Disease*, 13(4). <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04828-3>
- Ufartes, R., Schneider, T., Mortensen, L. S., Romero, C. de J., Hentrich, K., Knoetgen, H., Beilinson, V., Moebius, W., Tarabykin, V., Alves, F., Pardo, L. A., Rawlins, J. N. P., & Stuehmer, W. (2013). Behavioural and functional characterization of Kv10.1 (Eag1) knockout mice. *Human Molecular Genetics*, 22(11), 2247–2262. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt076>
- Urrego, D., Movsisyan, N., Ufartes, R., & Pardo, L. A. (2016). Periodic expression of Kv10.1 driven by pRb/E2F1 contributes to G2/M progression of cancer and non-transformed cells. *Cell Cycle*, 15(6), 799–811. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1138187>
- Wang, X., Chen, Y., Li, J., Guo, S., Lin, X., Zhang, H., Zhan, 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>
- Wang, X., Chen, Y., Zhang, Y., Guo, S., Mo, L., An, H., & Zhan, Y. (2017). Eag1 Voltage-Dependent Potassium Channels: Structure, Electrophysiological Characteristics, and Function in Cancer. *Journal of Membrane Biology*, 250(2), 123–132. <https://doi.org/10.1007/s00232-016-9944-8>
- Wang, X., Wang, Z. Bin, Luo, C., Mao, X. Y., Li, X., Yin, J. Y., Zhang, W., Zhou, H. H., & Liu, Z. Q. (2019). The prospective value of dopamine receptors on bio-behavior of tumor. In *Journal of Cancer* (Vol. 10, Issue 7, pp. 1622–1632). Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/jca.27780>

- Wang, Z. J., Soohoo, S. M., Tiwari, P. B., Piszczek, G., & Brelidze, T. I. (2020). Chlorpromazine binding to the PAS domains uncovers the effect of ligand modulation on EAG channel activity. *Journal of Biological Chemistry*, *295*(13), 4114–4123.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.012377>
- Warmke, J. W., Ganetzky, B., Hamilton, B., & Meyerowitz, E. (1994). A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Neurobiology*, *91*, 3438–3442.
- 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>
- Williams, E. D., Gao, D., Redfern, A., & Thompson, E. W. (2019). Controversies around epithelial–mesenchymal plasticity in cancer metastasis. *Nature Reviews Cancer*, *19*(12), 716–732.
<https://doi.org/10.1038/s41568-019-0213-x>
- Xue, Q., Liu, Z., Feng, Z., Xu, Y., Zuo, W., Wang, Q., Gao, T., Zeng, J., Hu, X., Jia, F., Zhu, Y., Xia, Y., & Yu, L. (2020). Penfluridol: An antipsychotic agent suppresses lung cancer cell growth and metastasis by inducing G0/G1 arrest and apoptosis. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *121*(September 2019). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109598>
- Yang, J., Antin, P., Berx, G., Blanpain, C., Brabletz, T., Bronner, M., Campbell, K., Cano, A., Casanova, J., Christofori, G., Dedhar, S., Derynck, R., Ford, H. L., Fuxe, J., García de Herreros, A., Goodall, G. J., Hadjantonakis, A. K., Huang, R. J. Y., Kalchauer, C., ... Sheng, G. (2020). Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 21, Issue 6, pp. 341–352). Nature Research.
<https://doi.org/10.1038/s41580-020-0237-9>
- Yu, H. B., Li, M., Wang, W. P., & Wang, X. L. (2016). High throughput screening technologies for ion channels. In *Acta Pharmacologica Sinica* (Vol. 37, Issue 1, pp. 34–43). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/aps.2015.108>
- Zakany, F., Pap, P., Papp, F., Kovacs, T., Nagy, P., Peter, M., Szente, L., Panyi, G., & Varga, Z. (2019). Determining the target of membrane sterols on voltage-gated potassium channels. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1864*(3), 312–325.
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.12.006>
- Zheng, J., Trudeau, M. C., & Trudeau, Z. . (2015). *HANDBOOK OF ION CHANNELS*. CRC Press, Taylor & Francis Group.

A continuación, se añaden las publicaciones resultantes de mi estancia en el LaNCa...

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/362395790>

The Kv10.1 Channel: A Promising Target in Cancer

Article in *International Journal of Molecular Sciences* · July 2022

DOI: 10.3390/ijms23158458

CITATIONS

5

READS

138

4 authors:



Enoch Luis

Universidad Nacional Autónoma de México

21 PUBLICATIONS 591 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Arely Anaya-Hernández

Universidad Autónoma de Tlaxcala

14 PUBLICATIONS 86 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Paulina León Sánchez

Universidad Nacional Autónoma de México

1 PUBLICATION 5 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Maria Luisa Duran-Pasten

Universidad Nacional Autónoma de México

11 PUBLICATIONS 68 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Review

The Kv10.1 Channel: A Promising Target in Cancer

Enoch Luis ^{1,2,*} , Arely Anaya-Hernández ³ , Paulina León-Sánchez ² and María Luisa Durán-Pastén ²

¹ Cátedras CONACYT—Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, C.U., Ciudad de México 04510, Mexico

² Laboratorio Nacional de Canalopatías, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, C.U., Ciudad de México 04510, Mexico; paulina_leon_s369@ciencias.unam.mx (P.L.-S.); mlduran@ifc.unam.mx (M.L.D.-P.)

³ Centro de Investigación en Genética y Ambiente, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Km. 10.5 Autopista Tlaxcala-San Martín, Tlaxcala 90120, Mexico; arely.anayahernandez@uatx.mx

* Correspondence: enoch@ifc.unam.mx

Abstract: Carcinogenesis is a multistage process involving the dysregulation of multiple genes, proteins, and pathways that make any normal cell acquire a cancer cell phenotype. Therefore, it is no surprise that numerous ion channels could be involved in this process. Since their discovery and subsequent cloning, ion channels have been established as therapeutic targets in excitable cell pathologies (e.g., cardiac arrhythmias or epilepsy); however, their involvement in non-excitable cell pathologies is relatively recent. Among all ion channels, the voltage-gated potassium channels Kv10.1 have been established as a promising target in cancer treatment due to their high expression in tumoral tissues compared to low levels in healthy tissues.

Keywords: oncogenic channel; Kv10.1; hallmarks of cancer; oncochannelopathies



Citation: Luis, E.; Anaya-Hernández, A.; León-Sánchez, P.; Durán-Pastén, M.L. The Kv10.1 Channel: A Promising Target in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 8458. <https://doi.org/10.3390/ijms23158458>

Academic Editors:

Ignacio Camacho-Arroyo,
Jorge Melendez-Zajgla, Mahara
A. Valverde Ramirez and
Mauricio Rodriguez-Dorantes

Received: 28 June 2022

Accepted: 27 July 2022

Published: 30 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Ion channels are pore-forming proteins that facilitate the movement of ions through the plasma membrane following their electrochemical gradients. Some ion channels are activated when they detect changes in the electrical potential across the membrane (voltage-gated), and others by extracellular or intracellular signals (ligand-gated) such as neurotransmitters or second messenger, respectively [1,2].

Voltage-gated ion channels (VGICs) are the main proteins that define cell excitability, and they are classified according to the ion moving through them (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) [3]. In excitable cells (secretory cells, muscles, or neurons), VGICs generate regenerative responses called action potentials, which initiate major cellular events, including vesicular exocytosis, neurotransmitter release, or muscle contraction.

Around 145 VGIC have been described in mammalian cells, 40 of these are voltage-gated potassium channels (Kv), making them the most diverse (structurally and functionally) channel family [4]. Kv channels are expressed in excitable and non-excitable cells. Their activity regulates several biological processes, including control of neuronal excitability, heart rate, electrolytic balance, and cell division [4,5]. Given their wide localization, diverse structural arrays, and multiple physiological functions, Kv channel malfunctions are associated with several diseases and, consequently, are considered ideal drug discovery targets [6–8].

2. The Voltage-Gated Potassium Channel Kv10.1

According to their amino acid sequence homology, Kv channels are divided into 12 subfamilies (Kv1 to Kv12) and are assembled as tetramers. Kv10, Kv11, and Kv12 channel subtypes form the EAG (*ether-à-go-go*) family all regulate the K^+ movement and work as modulators of cell excitability in different brain regions and heart [9,10]. The name EAG was assigned by a *Drosophila melanogaster* mutant fly, which exhibited a hyperexcitable

phenotype characterized by leg-shaking under ether anesthesia [11]; later, cloning revealed that this phenotype was produced by the loss of a voltage-gated potassium channel, the Kv10.1 (also named eag1) [12].

2.1. The *KCHN1* Gene

In humans, the Kv10.1 channel is encoded by the Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily H Member 1 (*KCHN1*) gene. *KCHN1* is located in chromosome 1, band q32.2, and comprises 457,343 bases and 12 exons [13]. Homologous genes have also been identified in *Drosophila melanogaster*, chicken, cow, zebrafish, mouse, and rat [12,14–18]. Neurodevelopmental disorders associated with a gain-of-function of the *KCHN1* include the Temple-Baraitser Syndrome and Zimmermann-Laband Syndrome [19,20].

2.2. Kv10.1 Structure

In humans, the *KCHN1* gene encodes a 989 amino acid protein with an estimated molecular mass of 111,423 Da. Like other Kv, a functional Kv10.1 is formed by assembling four pore-forming subunits. The transmembrane core of each subunit consists of six transmembrane α -helices (S1–S6). Segments S1–S4 form the voltage sensor domain, with S4 carrying the positively charged amino acids that move in response to a depolarization of the membrane potential. Segments S5–S6 form the pore domain of the channel, and the loop P (among S5–S6) is responsible for the K⁺-selectivity. Kv10.1 has large intracellular N- and C-termini, which account for ~70% of its molecular mass; also, both intracellular termini have several modulatory domains. The N-terminus contains a Per-Arnt-Sim (PAS) domain. The C-terminus contains a cyclic nucleotide-binding homology domain (cNBHD), a C-linker, a ciliary localization signal, and a tetramerizing coiled-coil domain (TCC) [21,22]. Moreover, three calmodulin-binding domains (CaMBD) have been described in both termini. As well as other ion channels, Kv10.1 undergoes N-linked glycosylation (posttranslational modification) in the N388 and N406 sites, which is essential for the correct trafficking of the channels to the membrane [21,23].

Notably, at least four splice variants of the human *KCHN1* gene have been described. Two similar variants named Kv10.1a (the originally cloned) and Kv10.1b (a long splice variant with additional 27 amino acids) form active ion channels with similar electrophysiological properties [15,24]. Additionally, two shorter non-functional channel variants (lacking their transmembrane segments) known as E65 and E70 (with a molecular weight of 65 and 70 kDa, respectively) have been detected in melanoma cell lines (IPC298 and IGR39), neuroblastoma cell lines, and the human brain [25].

2.3. General Biophysical and Pharmacological Properties

Kv10.1 channels are activated (open) at positive membrane potentials. One distinguishing property of Kv10.1 is that their activation-kinetic is strongly dependent on membrane potential: Kv10.1 currents activate faster when the membrane potential is more depolarized. In patch-clamp experiments, during a sustained depolarization stimulus, Kv10.1 activation is generated, slowly activating outward currents that do not show inactivation in the presence of the stimulus [21].

Due to the high homology with other members of the EAG family, finding a selective Kv10.1 blocker has been challenging. Several Kv10.1-blockers have been described [26,27]; however, none of these compounds are sufficiently specific for Kv10.1, having many targets. Classical Kv blockers, like TEA or 4-AP, show only a slightly inhibitory effect on Kv10.1 activity [12]. The small molecule and anti-histaminic drug astemizole is perhaps the best known and most used Kv10.1 blocker [28]. Recently, antibody engineering has emerged as a promising pharmacological tool for studying ion channels involved in diverse diseases, including cancer [29,30]. Currently, a specific monoclonal antibody (mAb56) and a nanobody coupled to TNF-related apoptosis-induced ligand (TRAIL) reduce cell growth and selectively induce apoptosis in cell lines expressing Kv10.1, respectively [31,32].

2.4. Tissue Expression

Kv10.1 channels are proteins embedded in the plasma membrane; however, it is also possible to find them in the membrane of subcellular structures: at the inner nuclear membrane [33], intracellular vesicles [34], and close to the primary cilium [35].

In healthy or physiological conditions, Kv10.1 is virtually undetected in peripheral tissues, only showing an enriched expression in specific brain regions (see the GTEx portal: www.gtexportal.org/home/gene/KCNH1, accessed on 24 July 2022). Through different approaches, either as protein or mRNA, Kv10.1 has been detected in the olfactory bulb, cerebral cortex, hippocampus, hypothalamus, striatum, and the presynaptic terminal of the parallel fiber-Purkinje cell synapses [10,13,24,36,37]. The study of the functional role of Kv10.1 in these brain regions in a physiological context remains incomplete. Kv10.1 is also transiently expressed during myoblast differentiation [13,38]. Kv10.1 expression is also reported in 100% of cervical samples of pregnant women, in contrast with a lower expression in non-pregnant ones, suggesting a hormonal regulation of the channel [39]. Moreover, Kv10.1 was reported in stem cells localized at colonic crypts [40].

In contrast, ectopic expression of Kv10.1 is frequently detected in tumor biopsies (Figure 1, Table 1) and cancer cell lines; several reports estimate that Kv10.1 is overexpressed in around 70% of clinical tumor samples [24,41–48], where the Kv10.1 expression seems to confer some malignant or oncogenic properties, e.g., sustained proliferation. This effect has been corroborated by in-vitro and in-vivo pharmacological studies using non-selective Kv10.1-blockers or siRNA, both showing positive results (Table 2), i.e., reducing proliferation rate in cancer cell lines or xenograft tumor size in immunodeficient mice [24,31,32,49–52].

Besides, Kv10.1 ectopic expression has been linked to chemoresistance cell phenotypes. Thus, Kv10.1 channel inhibition could improve cell response to therapeutic drugs typically used in chemotherapy. In-vitro experiments in ovarian cancer cells showed that Kv10.1 expression is associated with chemoresistance to cisplatin. The combination of Kv10.1 downregulation and cisplatin increased cell apoptosis in ovarian cancer cells compared with cells treated with cisplatin alone [53]. Similar results have been observed in the chemoresistant glioblastoma cell line U251AR, a cell line that showed high Kv10.1 (mRNA and protein) levels. Interestingly, U251AR cells became more sensitive to chemotherapeutic drugs when Kv10.1 expression was downregulated [54]. Agarwal et al. showed apoptosis induction by chemotherapeutic drugs (cytarabine, etoposide, idarubicin, and doxorubicin), commonly used to treat acute myeloid leukemia (AML), induced some degree of caspase activation in PLB-985 and K562 cells and primary cultured cells from a patient with AML. However, when these drugs were combined with astemizole or mAb56 (Kv10.1 blockers), this resulted in a further increase of caspase activity and, therefore, higher apoptosis, which is a desirable therapeutic effect [44].

On the other hand, radiotherapy has been widely used for several years to treat cancer in many ways and with high efficiency. To assess cellular radioresistance, Luis et al. irradiated with gamma radiation (4 Gy) to HEK293-WT cells and HEK293 cells stably expressing the Kv10.1 channel. Survival curves showed HEK-Kv10.1 cells remained unchanged after irradiation. In contrast, the survival curve of HEK-WT cells dramatically decreased with a 4 Gy radiation, suggesting that the expression of Kv10.1 confers to cells a radioresistant phenotype [55].

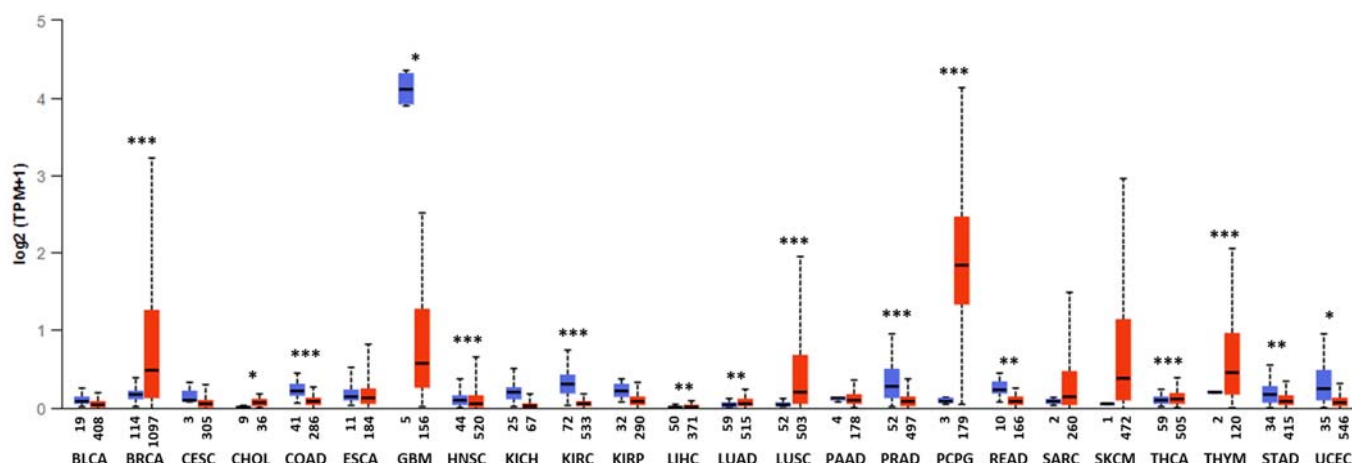


Figure 1. mRNA expression of *KCNHI* across TCGA cancers in normal and tumor samples. Log of transcript per million (TPM) of *KCNHI* mRNA from normal samples (blue box) and tumor samples (red box). The abscissa axis shows the number of samples and the type of tumor. The cancer genome atlas (TCGA), bladder urothelial carcinoma (BLCA), breast invasive carcinoma (BRCA), cervical squamous cell carcinoma (CESC), cholangiocarcinoma (CHOL), colon adenocarcinoma (COAD), esophageal carcinoma (ESCA), glioblastoma multiforme (GBM), head and neck squamous cell carcinoma (HNSC), kidney chromophobe (KICH), kidney renal clear cell carcinoma (KIRC), kidney renal papillary cell carcinoma (KIRP), liver hepatocellular carcinoma (LIHC), lung adenocarcinoma (LUAD), lung squamous cell carcinoma (LUSC), pancreatic adenocarcinoma (PAAD), prostate adenocarcinoma (PRAD), pheochromocytoma and paraganglioma (PCPG), rectum adenocarcinoma (READ), sarcoma (SARC), skin cutaneous melanoma (SKCM), thyroid carcinoma (THCA), thymoma (THYM), stomach adenocarcinoma (STAD), uterine corpus endometrial carcinoma (UCEC). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$. Data obtained from UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu>, accessed on 24 July 2022) [56].

Table 1. Kv10.1 expression in cancer.

Cancer Type/Sample	Technique	Number of Samples	Kv10.1 Level Expression in Tumor Tissue	Kv10.1 Level Expression in Normal Tissue	Ref.
Liver carcinoma (hepatocellular carcinoma PTB)	IHC/RT-PCR	10	100% strongly positive	Completely negative	[41]
Colon cancer (colonic crypt cells)	Reverse transcription-PCR/FISH	2	100% detected	No transcripts were detected	[57]
Cervical cancer (primary culture biopsies)	Reverse transcription-PCR/SB	6	100% detected	33% detected in normal biopsies ($n = 12$)	[58]
Lung cancer (bronchus carcinoma PTB)	IHC/RT-PCR	10	90% highly positive	Bronchial epithelium was negative; some Kv10.1 expression in the sub mucous glands	[41]
Prostate cancer (Prostate Carcinoma)	IHC/RT-PCR	56	98% strongly positive	Faintly detectable in normal prostate epithelium	[41]
Cervical cancer (DCC)	ICC	13 HG; 36 LG	92% in HG-DCC; 67% in LG-DCC	27% of the normal samples ($n = 184$)	[59]
Prostate cancer (tumor tissue)	RT-PCR/IHC	-	89% of ADPCa 87% of AIPCa	7% in normal peritumoral tissue of ADPCa and AIPCa	[60]

Table 1. Cont.

Cancer Type/Sample	Technique	Number of Samples	Kv10.1 Level Expression in Tumor Tissue	Kv10.1 Level Expression in Normal Tissue	Ref.
Breast cancer (breast carcinoma PTB)	IHC/RT-PCR	230	Detected in 85%	The mammary epithelium was negative	[41]
Cerebral cancer (brain metastases, GBM)	IHC	75 BM; 71 GBM	85% of brain metastases. 78% of GBM	Under physiological conditions, Kv10.1 expression is restricted to the CNS	[61]
Head and neck cancer (HNSCC biopsies)	Reverse transcription-RT-PCR	54	83% of HNSCC. 39% in normal adjacent epithelium of HNSCC	No expression was detected in normal epithelia from non-oncologic patient ($n = 44$)	[47]
Colon cancer (colon carcinoma) PTB	IHC/RT-PCR	8	75% strongly positive	Colon epithelium was negative or slightly positive	[41]
Sarcoma (soft tissue biopsies)	IHC	210	71% of soft tissue sarcoma(82% rhabdomyosarcoma; 75% synovial sarcoma)	Negative in surrounding normal tissue	[42]
Acute myeloid leukemia (blood or bone marrow)	RT-PCR	118	40% of AML samples (56% and 60% in M2 and M6 subtypes, respectively)	Not detectable in healthy peripheral blood cells ($n = 10$)	[44]
Ovarian cancer (biopsies)	TMA	336	16% high expression. 58% low/intermediate expression	Low level expression in normal ovary ($n = 6$)	[43]

Acute myeloid leukemia (AML), androgen-dependent prostate cancer (ADPCa), androgen-independent prostate cancer (AIPCa). Brain metastasis (BM), cancer tissue microarray (TMA), dysplastic cervical cytologies (DCC), fluorescence in-situ hybridization (FISH), glioblastoma multiforme (GBM), head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), high grade (HG), immunocytochemistry (ICC), immunohistochemistry (IHC), low grade (LG), real-time polymerase chain reaction (RT-PCR), Southern-blot (SB), primary tumor biopsies (PTB).

Table 2. Kv10.1 effects on cancer cell lines and/or its pharmacological inhibition.

Cancer Type (Cell Line)	Cell Process	Technique	Kv10.1 Participation in Cell Process	Kv10.1 Inhibition	Ref.
Breast cancer (MCF7)	Cell Proliferation	Pharmacological inhibition/MTS/flow cytometry	IGF-1 increased mRNA expression of Kv10.1 in a time-dependent manner with an enhancement of cell proliferation	Astemizole (10 μ M) and Quinidine (20 μ M) inhibited cell proliferation induced by IGF-1	[62]
Breast cancer (MCF7)	Cell Proliferation/Cell cycle	Electrophysiology/RT-PCR/Pharmacological inhibition/3H-Thymidine	Kv10.1 channel activity varied in a cell cycle-dependent manner	TEA (2, 6, and 10 mM) and Astemizole (2, 5, and 10 μ M) decrease proliferation and accumulate cells in G1 phase of the cell cycle	[63]
Breast cancer (MDA-MB-231)	Cell Migration	Pharmacological inhibition/siRNA/wound healing assay	Kv10.1 is required for cell migration by regulating Ca ²⁺ entry through Orai1 channels	Astemizole (5 μ M) reduces cell migration (45%)	[64]
Breast cancer (MDA-MB-231)	Cell Migration	Patch-clam/Pharmacological inhibition/siRNA/wound healing assay.	—	Chloroquine (30 μ M) inhibited 34% of potassium currents, and 100 μ M decreased cell migration (38%)	[65]

Table 2. Cont.

Cancer Type (Cell Line)	Cell Process	Technique	Kv10.1 Participation in Cell Process	Kv10.1 Inhibition	Ref.
Leukemia cell lines (PLB-985, UT-7, K562, HEL)	Cell proliferation	Pharmacological inhibition/siRNA	—	Astemizole (4 μ M) and imipramine (20 μ M) inhibited PLB-985, UT-7, and K562 cell proliferation (up to 77%); Knockdown of Kv10.1 expression by siRNA in PLB-985 and K562 cells diminished up to 80% cell proliferation	[44]
HNSCC-derived cell line (SCC42B, SCC40)	Cell proliferation/Cell invasion	siRNA/MTS/Matrigel invasion assays	Involvement of histone acetylation (i.e., H3Ac and H4K16Ac activating marks) in the regulation of Kv10.1 expression in HNSCC	Kv10.1 inhibition by siRNA reduced cell proliferation as well as invasive cell capacity	[47]
Prostate cancer (RWPE-1, WPE1-NB26)	Cell proliferation	RT-PCR/Fluorescence	WPE1-NB26 cells express high Kv10.1 protein in contrast to RWPE-1 cells expression.	Astemizole (2 μ M) decreased RWPE-1 cell proliferation; Astemizole (2 μ M) induced apoptosis in the WPE1-NB26 cells	[49]
Soft tissue sarcoma cell lines (RMS: TE-671, A-204; FS: HT-1080, Hs633t)	Cell proliferation	Pharmacological inhibition/siRNA	Kv10.1 participates in the proliferation of soft tissue sarcoma cell lines	Imipramine (10 μ M) and hEag1 inhibition by siRNA reduced cell proliferation (82%)	[42]
Malignant melanoma cells (IGR1)	Cell proliferation	Pharmacological inhibition/BrdU incorporation/MTT assay	Kv10.1 expression may be of importance for the proliferation of melanoma cells	Imipramine (10 μ M) reduces IGR1 cells proliferation; 30 μ M imipramine induces IGR1 cells apoptosis	[66]
Ovarian cancer (KKOV3 and TYK)	Cell apoptosis	Inhibition by siRNA/apoptosis assay/RT-PCR	Kv10.1 regulates cell apoptosis via NF- κ B pathway. Kv10.1 regulates P-glycoprotein expression	Knockdown of Eag1 by siRNA facilitated the sensitivity of ovarian cancer cells to cisplatin-induced apoptosis	[53]
Human glioblastoma cells (U251 and U251AR)	Cell growth and multi-drug resistance	Inhibition by miRNA/RT-PCR/drug sensitivity assay	Kv10.1 is involved in multi-drug resistance in glioblastoma cells	miR-296-3p regulates negatively Kv10.1 and suppresses cell proliferation drug resistance	[54]

Fibrosarcoma (FS), head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), microRNA (miRNA), nuclear factor κ -light chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B), real-time polymerase chain reaction (RT-PCR), rhabdomyosarcoma (RMS), small interfering RNA (siRNA), tetraethylammonium (TEA).

The Kv10.1 enriched expression in cancer cells, its limited expression in other tissues and its membrane localization make Kv10.1 a promising protein in cancer research, becoming a potential tumor marker or an anti-cancer drug target, with special interest on the molecular mechanisms that regulate its expression.

2.4.1. Regulatory Mechanisms of Kv10.1 in Cancer

Kv10.1 is under direct control of p53 and the retinoblastoma protein (pRb), two of the most altered proteins in cancer [67]. When p53 and pRb are down-regulated in cancer, the repression of the transcription factor E2F1 is lost [68]. Because in the promoter region of

the *KCNH1* gene there exist E2F1-responsive elements, up-regulation of E2F1 increases the Kv10.1 levels and vice versa [40,68].

Similarly, it has been shown that the human papillomavirus (VPH), considered one of the leading agents associated with cervical cancer, contains the transforming viral proteins E6 and E7, which are associated with enhancing proliferation and cancer progression [69]. These two oncoproteins, E6 and E7, target and reduce the expression of p53 and pRb, respectively, thereby increasing E2F1 and Kv10.1 expression. A positive correlation between E7 and Kv10.1 has been observed in cervical cancer biopsies [58].

Likewise, microRNAs (miRNAs) could control the expression of protein-coding genes, including ion channels [70–72]. In this context, p53 reduction would cause a decrease in miR-34a, which may function as a translational inhibitor of Kv10.1. miR-34a has a dual mechanism of Kv10.1 inhibition, a direct way at post-transcriptional level and an indirect way at the transcriptional level through repressing E2F1 [68]. Also, it has been reported that miR-296-3p is a Kv10.1-modulator. In glioblastoma, down-regulation of miR-296-3p increased Kv10.1 expression [54]; interestingly, miRNA's expression could be associated with multi-drug resistance, probably through regulating Kv10.1 [54]. Similarly, it has been observed that Kv10.1 expression seems to confer a radioresistant phenotype [55].

As we mentioned above, Kv10.1 expression could be associated with hormonal factors. In HeLa cells and cervical cancer primary cultures, estrogens have been observed to up-regulate Kv10.1 [73]. Besides, insulin-like growth factor-1 (IGF1) is involved in tumor overexpression of Kv10.1, an effect mediated by the Akt-dependent pathway [62]. In contrast, calcitriol, the hormonally-active form of vitamin D3, decreases Kv10.1 expression [50] through a negative vitamin D-response element located in the *KCNH1* promoter [74].

2.4.2. Epigenetic Regulation

Epigenetic changes are well-recognized mediators in gene expression and one source of variation in cancer. Last year, significant advances were made in understanding cancer epigenetics, especially regarding aberrant DNA methylation, chromatin remodeling, histone acetylation and methylation, posttranslational modifications, and non-coding RNAs deregulation [75].

DNA methylation involves the transference of a methyl group to the 5-carbon on cytosine residues in CpG sites [75]. A study on DNA methylation in human gastric carcinoma found hypermethylation in the CpG island of 15 genes, *KCNH1* was among them, suggesting a significant role in gastric cancer development [76]. *KCNH1* showed a three-times methylation-positive rate in gastric carcinoma samples than in noncancerous control samples [76]. However, it is needed to associate whether *KCNH1* hypermethylation may affect its expression in gastric carcinogenesis.

It has been proposed that early-life epigenetic changes may modify lung cell function and contribute to asthma risk [77]. Recent work found that early-life exposure to house dust mite allergen in a mouse model can alter DNA methylation and expression of diverse genes detected until three successive generations and associated with airway hyperresponsiveness and inflammation [77]. In the mice exposed to the allergens, the *Kcnh1* gene was hydroxymethylated and up-regulated, suggesting an association with asthma susceptibility [77].

In the head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), histone acetylation, but not DNA methylation, was suggested to be involved in the Kv10.1 regulation [47]. This work observed enrichment of two histone activating marks, H3Ac (H3 acetylation) and H4K16Ac (H4 lysine 16 acetylation), in HNSCC-derived cell lines expressing Kv10.1 [47].

MiRNAs are non-coding RNAs that regulate gene expression. As mentioned above, Kv10.1 can be modulated by diverse miRNAs that favor or repress its expression (Table 2) [54,68].

2.5. Kv10.1 Protein Degradation

Ion channels are highly fine-tuned proteins that are essential for cell physiology. Thus, the synthesis and degradation of ion channels should be a quality control process, which is necessary for correct cell function [78]. In this way, the ubiquitin system is the most studied mechanism of ion channel regulation. Nevertheless, knowledge about Kv10.1 synthesis and degradation is limited. Recently, it has been described that Kv10.1 protein degradation is dependent on E3 ubiquitin ligase cullin 7 (Cul7). Cul7 degrades both endoplasmic reticulum-localized immature and plasma membrane-localized matures Kv10.1 protein through the proteasomal and the lysosomal pathway, respectively [79]. In cooperation with this mechanism, the E3 ubiquitin ligase makorin ring finger protein 1 (MKRN1) has been described as another endoplasmic reticulum-localized mechanism of Kv10.1 degradation [80]. Both works demonstrated that Cul7 and MKRN1 are quality checkpoints of immature Kv10.1 channels.

3. Genetic Profile of KCNH1 Gene Using cBioPortal

Genomic profiling of tumor samples is a valuable tool to unravel potential tumor biomarkers. Genomic studies from cohort studies may provide researchers with insights into the more advanced genomic landscape of cancer pathogenesis and treatment. Nevertheless, incomplete information about the epidemiology and clinical profile of cancer cases has been a major obstacle to complex genomic exploration. In the last few years, open-access resources have been made available to datasets for cancer exploration.

The public cBioPortal for cancer genomics (<http://cbioportal.org>, accessed on 24 July 2022) is an open-access resource for interactive exploration of multidimensional genomic datasets hosted by the Center for Molecular Oncology at MSK [81,82].

In this review, the cBioPortal database was used to query the *KCNH1* gene in TCGA PanCancer Atlas Studies (10,953 patients/10,967 samples). As shown in Figure 2, in distinct types of cancer, *KCNH1* undergoes different genetic alterations, amplification being the most frequent in breast cancer. Therefore, this cancer is explored below.

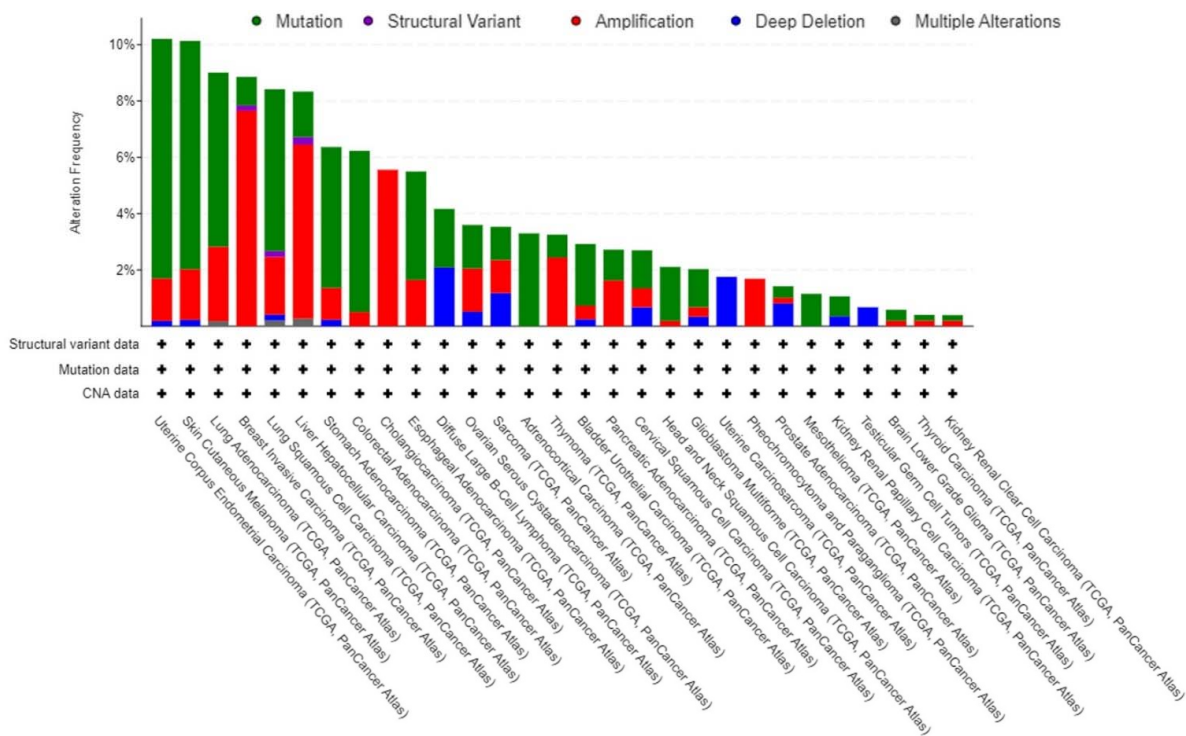


Figure 2. Genetic alteration profile of *KCNH1* gene using cBioPortal. Summary of genomic alteration frequency of *KCNH1* gene in different types of cancer (TCGA, PanCancer Atlas Studies). Copy-number alterations (CNA).

Breast cancer represents the most common cancer for women worldwide, with an estimated 47.8% of cancer incidence and 13.6% of cancer mortality [83] (GLOBOCAN 2018). Even though the molecular mechanisms associated with breast tumorigenesis have been extensively studied, the prognosis for different types is still unsatisfactory, indicating the necessity to find new biomarkers contributing to clinical decision-makers.

Gene amplification is a mechanism of deregulation of oncogenic activation, which results in overexpression of a gene and enhanced levels of the specific product. The amplification of the *KCNH1* gene is reported in five breast cancer studies, with a variation between 6.5–30.3% (Figure 3A). Because of this, gene amplification may have some clinical implications like diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers in cancer [84]. For example, *ERBB2* (*HER2*) gene amplification is a molecular target in breast cancer therapy [85,86].

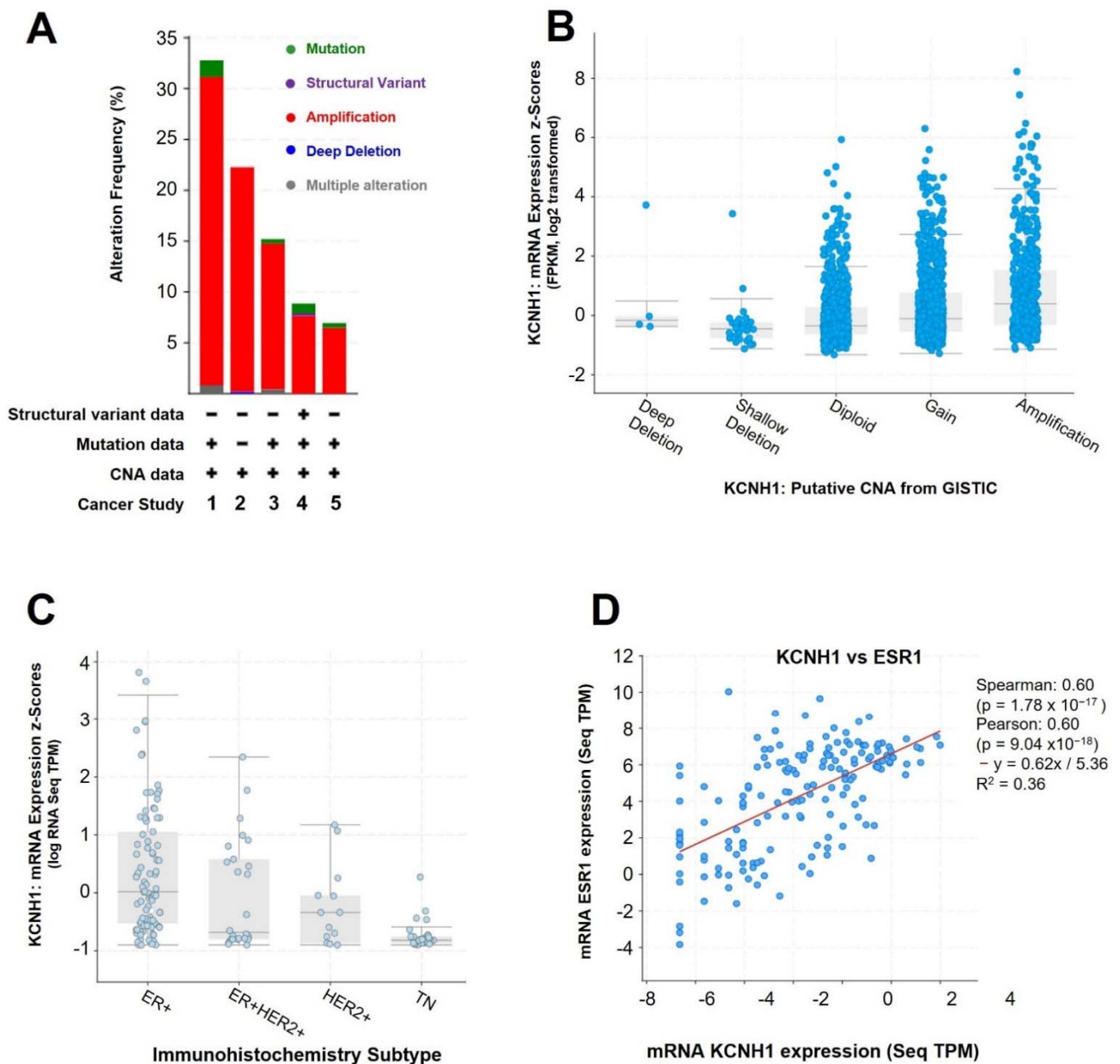


Figure 3. Genetic profile of *KCNH1* gene in breast cancer using cBioPortal. (A) Summary of genomic alteration frequency of *KCNH1* gene in five studies (1: CPTAC, Cell 2020; 2: METABRIC, Nature 2012 & Nat.

Commun. 2016; 3: Provisional, February 2020; 4: TCGA, PanCancer Atlas; 5: INSERM, PLoS Med 2016). (B) Relative expression levels as a function of relative copy number of *KCNH1* gene (Breast invasive carcinoma, TCGA, PanCancer Atlas). (C) Relative expression levels as a function of the immunohistochemistry subtype of breast cancer (Breast Cancer, SMC 2018). (D) Copy-number alterations (CNA), fragments per kilobase of transcript per million fragments mapped (FPKM), genomic identification of significant targets in cancer (GISTIC), sequencing transcript per million (Seq TPM), variants of uncertain significance (VUS).

The breast cancer (TCGA, PanCancer) dataset was selected to observe the relationship between copy number alterations and mRNA levels (Figure 3B). The gene amplification in low-level (gain) and high-level (amplification) show the highest levels of mRNA *KCNH1* expression, which may account for the increased expression of *KCNH1* in breast cancer [41].

Finally, the breast cancer (Breast Cancer, SMC 2018) dataset was chosen to study the relationship between RNA levels and immunohistochemistry subtype. Finally, the breast cancer (Breast Cancer, SMC 2018) dataset was chosen to study the relationship between RNA levels and immunohistochemistry subtype and its co-expression with other genes. Breast cancer samples with ER+ subtype showed significantly higher mRNA *KCNH1* expression (Figure 3C). *KCNH1* upregulation can be explained by the co-expression of the estrogen receptor (*ESR1*) and *KCNH1* genes (Figure 3D). Experimental studies already have reported that estrogens can regulate the expression of *KCNH1* [72]. Furthermore, other genes such as *ABAT*, *CELSR1*, *FOXA1*, *HHAT*, *CCDC96*, *RUNDC1*, *ELOVL5*, *CAPN8*, *LRRC46*, and *ZMYND10* show high co-expression with *KCNH1* (Spearman correlation 0.68–0.71; $p < 1.0 \times 10^{-23}$). Among them, the *CAPN8* and *LRRC46* genes have been poorly studied in breast cancer.

4. Hallmarks of Cancer and Kv10.1 Expression

An emerging research area is concerned with the role of ion channel expression and its implication beyond their classical functions as action potential generators or players in neuronal communication [53,54]. In this way, numerous reports have shown that ectopic ion channel's expression impacts cancer's hallmarks and thus the disease progression [8].

The oncogenic properties of Kv10.1 were first observed when its over-expression in heterologous systems led to a phenotypic transformation compatible with cancer cells, which are characterized by faster growth rates (even at low serum concentrations), loss of contact inhibition, and solid tumors formation when these cells were transplanted into immunodeficient mice [24]; this work detonates the studies of Kv10.1 in cancer biology; however, not all its properties are completely understood.

4.1. Proliferation and Cell Cycle

Ectopic expression of Kv10.1 is strongly associated with an increase in the rate of cell proliferation, which may be due to the simultaneous activation of several signaling pathways. One of them is related to its canonical function as an ion channel: effluxing K^+ , hyperpolarizing the membrane potential, and increasing the driving force for Ca^{2+} entry to the cell; once inside of the cell, Ca^{2+} would start different cascade signaling, including cell proliferation [87,88].

In this regard, changes in the expression and activity of ion channels during all cell cycle phases have been described [87,88], generating crucial cyclic oscillations in the membrane potential. Depolarization of the membrane potential seems essential in the early G1 phase, and hyperpolarization appears important for the transition from G1 to S phase during mitosis [87,88]. Similar observations were described by C.D. Cone, where the membrane potential was proposed as a cell cycle regulator, shows that fast proliferating cells (e.g., cancer cells) are more depolarized, while cells with hyperpolarized membrane potential (e.g., neurons) show no mitotic activity [89].

As we have seen, Kv10.1 transcription is regulated by factors implicated in cell cycle progression (most of them converging in E2F1); moreover, Kv10.1-pharmacological inhibition reduces cell proliferation rate in cells where it is overexpressed, suggesting Kv10.1 is temporally regulated. The first indication of this phenomenon was that Kv10.1-permeability and -expression level depends on the cell cycle [55]. Recently, it was demonstrated that E2F1, which controls Kv10.1, would be expressed just during a short period in the cell cycle and not constitutively as had been thought for many years. Thus, Kv10.1 is expressed preferentially in the transition G2/M in cancer and normal cells, and when Kv10.1 is down-regulated, the G2/M transition is delayed, and cells take longer to complete mitosis [40].

4.2. Primary Cilium: Proliferation and Migration through Microtubule Dynamics Modulation

The primary cilium is a non-motile microtubule-based organelle similar to an antenna that extends outside the cell surface and is essential for the transduction of different signals implicated in proliferation, differentiation, migration, etc. [90]. Since the Kv10.1 is known to have a premitotic expression during the transition G2/M, some authors suggest that the strong implications of the Kv10.1 channel in cell cycle progression are also related with cilia disassembly that typically provides signaling needed to start proliferation [35,40]. Its participation in that process is evident since the cyclic expression of Kv10.1 has been shown to be present in the base of primary cilia of hTERT RPE-1 cells, which might result in a significant disposability of microtubules for consequent processes [91]. This signaling occurs soon after the Kv10.1-induced hyperpolarization favors the increase of Ca^{2+} moving through different calcium-permeable ion channels (L-Type, TRPC1, TRPV4, TRPP1, TRPP2, PKD2L1) [92–94]. Consequently, the increase of cytosolic Ca^{2+} recruits CaM activation. As a result, CaM triggers Aurora Kinase A (AURKA) activation, a serine-threonine protein kinase displayed to act as an effector protein in primary cilia reabsorption [92]. Otherwise, according to an AURKA interactome inspired by The Cancer Genome Atlas Program (TCGA), it is reported that AURKA can establish interactions between a large number of proteins involved in different oncogenic-related pathways such as FOXO, PI3K-Akt, Hippo signaling pathway, and apoptosis [95].

In regards to microtubule activity, the upper regulation of Kv10.1 is closely implicated in a significant increase of microtubule dynamics characterized by the growth rate of assembly and disassembly [96], because of this, an important linkage between Kv10.1 overexpression and some processes that include organelles and cell motility exists. Therefore, this is likely to connect the microtubule dynamics with the activation of Rho/GTPase, which is highly involved in actin polymerization led by myosin. Those cytoskeletal elements provide the required heading structures involved in focal adhesions, which are tightly related with cell migration owing to its interactions with the extracellular matrix [97]. However, the link between the Ca^{2+} channel PIEZO2 and the Rho activation has just been experimentally demonstrated [98]. Furthermore, a checkpoint Kv10.1-dependent named spindle assembly checkpoint (SAC) has been displayed, which is consistent with the fact that kinetochore-microtubule binding during cell division showed a decrease in error alignment rate of 20% and generates a delay before anaphase starting; these dependent Kv10.1 responses are suggested to be engaged with the activity of mitotic checkpoint complex (MCC) [96].

Moreover, a significant decrease in MDA-MB-231 cell migration rate when Kv10.1 is exposed to specific blockers like astemizole has already been proved [64]. Some hypotheses concluded that cell migration led by Kv10.1 channel could mainly trigger changes in microtubule dynamics as a result of hyperpolarization of action potential, which have been proved to induce calcium entry through ORAI1, and their association with secretory pathway Ca^{2+} ATPase (SPCA2) seems to be also implicated in proliferation and survival in cancer cells [99]. In contrast, it is thought that the interactions between Kv10.1 and cell migration are mediated mainly by the phosphorylation of kinase focal adhesions (FAK) [100].

4.3. Non-Canonical Role of Kv10.1 as Ion Channel and Angiogenesis

Ion channels can influence different signaling pathways through non-canonical function, involving protein-protein interactions independent of ion flux [101,102]. It might be surprising that some functions of Kv10.1 on cancer progression would be separate from its conducting properties. Transfection of the *Drosophila* Kv10.1 channel into mammalian cultured cells stimulated cell proliferation. This effect is maintained even when non-conducting channel mutants were used through an increase in the p38 MAPK activity [103].

It has been shown that the non-conducting properties of Kv10.1 seem to give rise to tumors and angiogenesis. Transplant of cells expressing non-conducting Kv10.1 mutants can produce tumors, indicating ion permeation is not required [52]. The same study showed that conductive and non-conductive Kv10.1 channels favor neovascularization in tumors, a mechanism mediated by the up-regulation of the hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and the vascular endothelial growth factor (VEGF) [52].

4.4. Cell Survival

Also, trial cooperation between the Ca²⁺ channel Orai1, SPCA2 protein, and Kv10.1 has been recognized with strong participation in intracellular Ca²⁺ entry but also plays a significant role in collagen-1-induced breast cancer cell survival via DDR (Discoidin-Domain Receptors), a specific collagen 1 receptor, that seems to be tightly involved in ERK1/2 phosphorylation [104]. Cell survival via Orai1, SPCA2, and Kv10.1 may be explained by protein-protein interactions between each element implicated. For instance, the N-terminal and C-terminal of SPCA2 interact with Kv10.1. The former terminal seems to participate in Kv10.1 expression, trafficking, and activity, while the C-terminal interactions evoke trafficking, expression, activity, and Ca²⁺ entry [99]. That partnership cooperation was demonstrated to promote the Ca²⁺ entry just after the Kv10.1 membrane hyperpolarization occurs [105].

4.5. Cell Metabolism Remodeling

In 2011, Hanahan & Weinberg provided a new generation of cancer hallmarks by introducing emergent hallmarks just as (1) avoiding immune destruction and (2) cell metabolism remodeling [106]. On the latter, overwhelming results show that Kv10.1 is also responsible for metabolism remodeling in cancer cells through mitochondrial metabolism modulation. The Kv10.1 dependent-mitochondrial metabolism was tested by measuring whether mitochondrial metabolism inhibitors, such as Metformin, Phenformin & VLX600 had a differential effect over cell lines with a moderate expression of Kv10.1 in contrast to cells with Kv10.1 overexpressed. The results showed that in HeLa, Du145, and MDAMB43S5 cells, where Kv10.1 was overexpressed, the metabolism inhibitors' sensitivity was increased, while in those cells with Kv10.1 moderate expression (MCF-7, MDAMB231, MiaPaCa2 & Panc-1) a poor metabolism inhibitor sensitivity was shown. In the same way, this could explain how metabolism Kv10.1-dependence is involved in apoptosis inhibition, since when Kv10.1 is blocked or its expression is inhibited, it triggers a mitochondrial fragmentation that leads to an increase of reactive oxygen species (ROS) that ultimately promotes increased autophagy [107].

5. Tumor Microenvironment and Kv10.1

The tumor microenvironment (TME) is a complex and continuously evolving entity. This microenvironment is generated by several factors such as low extracellular pH, hypoxic regions, metabolic abnormalities, and extracellular matrix modifications [108].

One distinguishing feature is that cancer cells develop in acidic microenvironments, small regions where the extracellular pH (pHe) is low compared with normal cells [109]. Under physiological conditions, extracellular pH in most of the body's tissues is around 7.3–7.4, while in microenvironments created by tumors, pHe can drop to ranges between 6.2 and 6.8 [109,110]. It has been observed that extracellular pH acidification inhibits voltage-

gated K⁺ channels [111], including Kv10.1 [112,113]. This inhibition could explain, in part, the overexpression of this channel in cancer cells as a compensatory mechanism. Nevertheless, in T₈₄ colonic carcinoma cells, hyperpolarization of the membrane potential induced by Kv10.1 (and other Kv channels) controls cell proliferation by affecting intracellular pH and Ca²⁺ signaling [114].

The extracellular matrix (ECM) is a 3D structure of different protein components, including collagen, fibronectin, proteoglycans, and glycoproteins [108]. During the carcinogenic process, changes in the TME induce alterations in the ECM components that contribute to the tumor progression. Indeed, it has been observed that ECM components modulate Kv10.1. CHO cells expressing Kv10.1 suffer a cytoskeleton and lamellipodia reorganization when grown on collagen, suggesting an increase in cell movement [115]. In contrast, growing cells on fibronectin induce the formation of stress fibers, indicating a role of Kv10.1 in the cytoskeletal organization in cancer [115]. Furthermore, compared with CHO-WT cells, those cells expressing the Kv10.1 channel could proliferate despite being kept under total serum deprivation [115]. Interestingly, it has been observed that collagen 1 increases cell survival in breast cancer cell through ERK1/2 phosphorylation and the overexpression of Kv10.1 and ORAI1, which are effects mediated by the activation of the tyrosine kinase receptor activated by collagen, DDR1 [104].

On the other hand, a relationship has been observed between Kv10.1 expression and an increase in vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion, as well as the expression of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α), one of the most important factors promoting angiogenesis. It has been proposed that Kv10.1 interferes with hypoxia homeostasis by increasing basal HIF-1 α activity and lowering the threshold of HIF-1 α activation [52]. Besides, Lai et al. showed that co-expression of the Kv10.1 channel and HIF-1 α in human breast cancer samples were related to the tumor size and status [116].

6. Conclusions

For over 70 years, knowledge about ion channels has increased exponentially. Today, it is well known that ion channels are “probably” involved in all physiological processes, and their dysfunction is the origin of diverse pathologies, making them pharmacological targets for the potential development of new compounds with clinical relevance. Currently, it is estimated that 18% of drugs used in the clinic have an ion channel as their target [117]. Drugs targeting K⁺ channels are used to treat metabolic, neurologic, and cardiac disorders with promising results [118].

Undoubtedly, the Kv10.1 channel plays an active role in carcinogenesis (Figure 4), becoming a protein with great potential for cancer therapeutics. Its membrane nature simplifies the development and carry-on of a molecule with pharmacological activity. As we have seen, its properties as a membrane protein, its high expression in cancerous tissue versus low expression in healthy tissue, and its participation in various cancer hallmarks make it a promising target for the design of new therapeutic strategies that combined with the current ones could decrease the tumorigenic process.

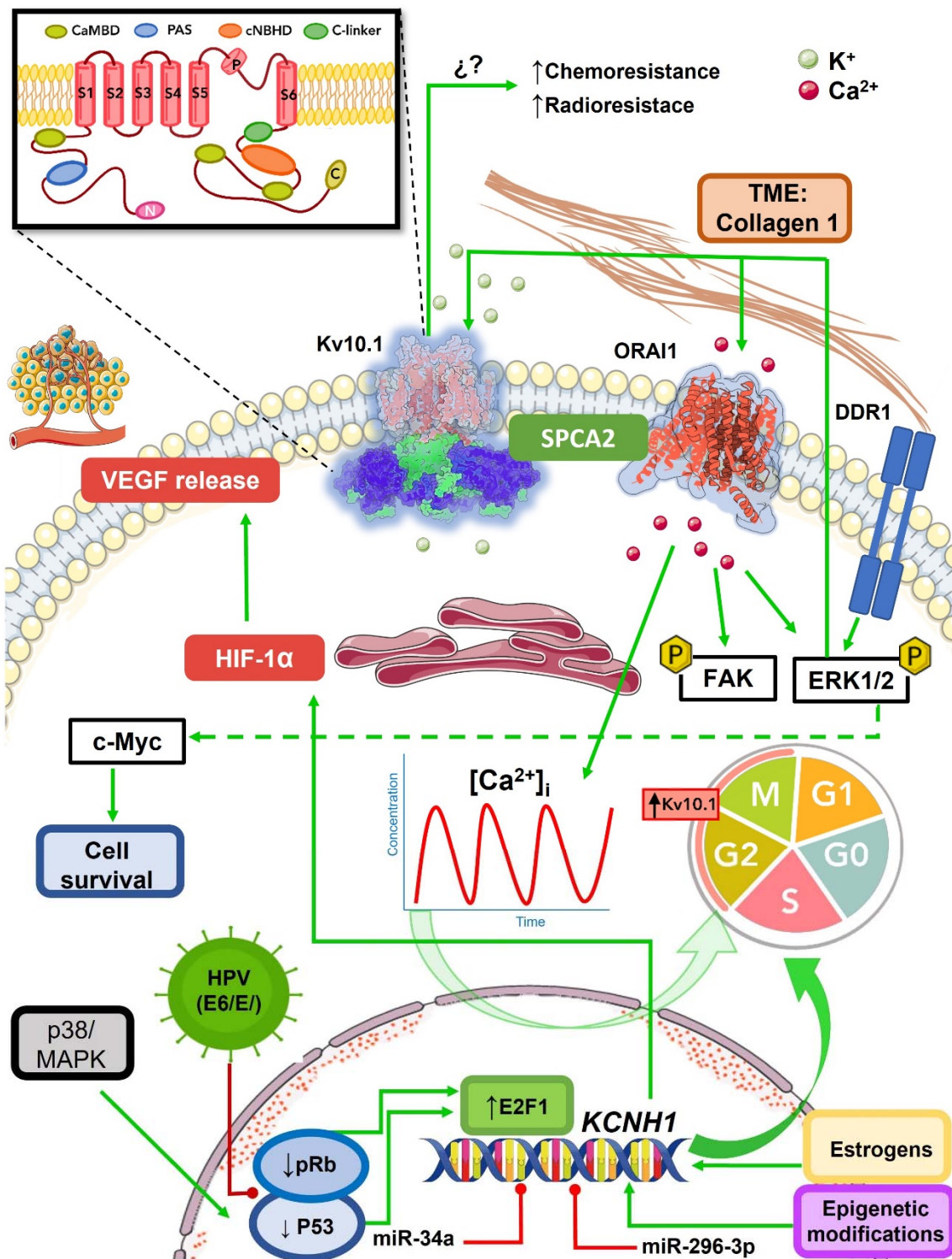


Figure 4. Schematic representation of Kv10.1 regulation in cancer. Kv10.1 is an ion channel permeable to K⁺ (green spheres) mainly localized in the plasma membrane, but also is found in subcellular structures. The crystal structure of the Kv10.1 channel is embedded in the plasma membrane, with the transmembrane region in red and the intracellular N- and C-termini represented in purple and green, respectively. The figure in the upper left corner represents a Kv10.1 subunit; transmembrane segments (S1–S6) are represented in red, the N-termini PAS domain in blue, the C-linker in green, the cNBHD in orange, and the 3 CaMBD in olive. A functional channel is assembled as a tetramer. Kv10.1 has been described as an oncogenic channel, exerting its effects through different hypothesized mechanisms.

The canonical function of Kv10.1 consists of efflux K^+ and hyperpolarized membrane potential. The membrane hyperpolarization increases the driving force for Ca^{2+} , promoting the signal pathways involved in cell division. Kv10.1 expression is under the control of p53 and pRb; when p53 and pRb are down-regulated in cancer, an increase of E2F1 occurs, which triggers Kv10.1 expression. During the cell cycle, Kv10.1 is expressed during the G2/M transition. Alterations in the p53 and pRb pathways consequently affect the Kv10.1 levels, e.g., the oncoproteins E6 and E7 of the HPV reduce the expression of p53 and pRb, respectively. Other factors influencing Kv10.1 expression include hormones, miRNAs, epigenetic modifications, and components of the tumor microenvironment (e.g., collagen). Collagen 1 can activate the DDR1 pathway, increasing the ERK1/2 phosphorylation, which increases the Kv10.1 and ORAI1 levels in the plasma membrane. ERK1/2 phosphorylation, Kv10.1, and ORAI1 increased cell survival. Kv10.1 expression is also associated with angiogenesis through upregulation of the HIF-1 α activity, increasing VEGF release. In addition, cells over-expressing Kv10.1 channels seem more resistant to cancer drug treatments and radiotherapy; however, the molecular mechanisms implicated in these resistant phenotypes are not completely understood.

Author Contributions: Conceptualization, E.L.; investigation, writing—review and editing, E.L., P.L.-S., A.A.-H. and M.L.D.-P.; visualization and supervision, E.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by SEP-CONACYT, grant number CB2017-2018-A1-S-13646.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data from Section 3 is available in <http://cbiportal.org>.

Acknowledgments: The English revision by Pamela Robles Martínez is acknowledged. Most of Figure 4 was designed thanks to images licensed as CC-BY 3.0 and are freely available at <https://bioicons.com/> (accessed on 24 July 2022). In Figure 4, Kv10.1 and ORAI1 channels were created using the online molecular viewer “The protein Imager” [119].

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Purves, D.; Augustine, G.J.; Fitzpatrick, D.; Hall, W.C.; LaMantia, A.-S.; McNamara, J.O.; White, L.E. Chapter 4 Ion Channels and Transportes. In *Neuroscience*, 6th ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2018; pp. 65–85. ISBN 9781605353807.
2. Hille, B. Chapter 1 Introduction. In *Ion Channels of Excitable Membranes*; Sinauer Associates, Inc.: Sunderland, MA, USA, 2001; pp. 1–22. ISBN 0878933212.
3. Alexander, S.P.H.; Striessnig, J.; Kelly, E.; Marrion, N.V.; Peters, J.A.; Faccenda, E.; Harding, S.D.; Pawson, A.J.; Sharman, J.L.; Southan, C.; et al. THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2017/18: Voltage-Gated Ion Channels. *Br. J. Pharmacol.* **2017**, *174*, S160–S194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Taura, J.; Kircher, D.M.; Gameiro-Ros, I.; Slesinger, P.A. Comparison of K^+ Channel Families. In *Handbook of Experimental Pharmacology*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2021; Volume 267.
5. González, C.; Baez-Nieto, D.; Valencia, I.; Oyarzún, I.; Rojas, P.; Naranjo, D.; Latorre, R. K^+ Channels: Function-Structural Overview. *Compr. Physiol.* **2012**, *2*, 2087–2149. [[CrossRef](#)]
6. Ranjan, R.; Logette, E.; Marani, M.; Herzog, M.; Tâche, V.; Scantamburlo, E.; Buchillier, V.; Markram, H. A Kinetic Map of the Homomeric Voltage-Gated Potassium Channel (Kv) Family. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*, 358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Mathie, A.; Veale, E.L.; Golluscio, A.; Holden, R.G.; Walsh, Y. Pharmacological Approaches to Studying Potassium Channels. In *Handbook of Experimental Pharmacology*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2021; Volume 267.
8. Prevarskaya, N.; Skryma, R.; Shuba, Y. Ion Channels in Cancer: Are Cancer Hallmarks Oncochannelopathies? *Physiol. Rev.* **2018**, *98*, 559–621. [[CrossRef](#)]
9. Bauer, C.K.; Schwarz, J.R. Ether-à-Go-Go K^+ Channels: Effective Modulators of Neuronal Excitability. *J. Physiol.* **2018**, *596*, 769–783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Martin, S.; Lino de Oliveira, C.; Mello de Queiroz, F.; Pardo, L.A.; Stühmer, W.; Del Bel, E. Eag1 Potassium Channel Immunohistochemistry in the CNS of Adult Rat and Selected Regions of Human Brain. *Neuroscience* **2008**, *155*, 833–844. [[CrossRef](#)]
11. Kaplan, W.D.; Trout, W.E. The Behavior of Four Neurological Mutants of *Drosophila*. *Genetics* **1969**, *61*, 399–409. [[CrossRef](#)]
12. Brüggemann, A.; Pardo, L.A.; Stühmer, W.; Pongs, O. Ether-à-Go-Go Encodes a Voltage-Gated Channel Permeable to K^+ and Ca^{2+} and Modulated by CAMP. *Nature* **1993**, *365*, 445–448. [[CrossRef](#)]

13. Occhiodoro, T.; Bernheim, L.; Liu, J.H.; Bijlenga, P.; Sinnreich, M.; Bader, C.R.; Fischer-Lougheed, J. Cloning of a Human Ether-a-Go-Go Potassium Channel Expressed in Myoblasts at the Onset of Fusion. *FEBS Lett.* **1998**, *434*, 177–182. [[CrossRef](#)]
14. Ludwig, J.; Terlau, H.; Wunder, F.; Bruggemann, A.; Pardo, L.A.; Marquardt, A.; Stühmer, W.; Pongs, O. Functional Expression of a Rat Homologue of the Voltage Gated Ether a Go-Go Potassium Channel Reveals Differences in Selectivity and Activation Kinetics between the Drosophila Channel and Its Mammalian Counterpart. *EMBO J.* **1994**, *13*, 4451–4458. [[CrossRef](#)]
15. Warmke, J.W.; Ganetzky, B. A Family of Potassium Channel Genes Related to Eag in Drosophila and Mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 3438–3442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Stengel, R.; Rivera-Milla, E.; Sahoo, N.; Ebert, C.; Bollig, F.; Heinemann, S.H.; Schönherr, R.; Englert, C. Kcnh1 Voltage-Gated Potassium Channels Are Essential for Early Zebrafish Development. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 35565–35575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Frings, S.; Brüll, N.; Dzeja, C.; Angele, A.; Hagen, V.; Kaupp, U.B.; Baumann, A. Characterization of Ether-a-Go-Go Channels Present in Photoreceptors Reveals Similarity to I(K_x), a K⁺ Current in Rod Inner Segments. *J. Gen. Physiol.* **1998**, *111*, 583–599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Robertson, G.A.; Warmke, J.W.; Ganetzky, B. Potassium Currents Expressed from Drosophila and Mouse Eag cDNAs in Xenopus Oocytes. *Neuropharmacology* **1996**, *35*, 841–850. [[CrossRef](#)]
19. Simons, C.; Rash, L.D.; Crawford, J.; Ma, L.; Cristofori-Armstrong, B.; Miller, D.; Ru, K.; Baillie, G.J.; Alanay, Y.; Jacquinet, A.; et al. Mutations in the Voltage-Gated Potassium Channel Gene KCNH1 Cause Temple-Baraitser Syndrome and Epilepsy. *Nat. Genet.* **2015**, *47*, 73–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Kortüm, F.; Caputo, V.; Bauer, C.K.; Stella, L.; Ciolfi, A.; Alawi, M.; Bocchinfuso, G.; Flex, E.; Paolacci, S.; Dentici, M.L.; et al. Mutations in KCNH1 and ATP6V1B2 Cause Zimmermann-Laband Syndrome. *Nat. Genet.* **2015**, *47*, 661–667. [[CrossRef](#)]
21. Whicher, J.R.; MacKinnon, R. Structure of the Voltage-Gated K⁺ Channel Eag1 Reveals an Alternative Voltage Sensing Mechanism. *Science* **2016**, *353*, 664–669. [[CrossRef](#)]
22. Barros, F.; de la Peña, P.; Domínguez, P.; Sierra, L.M.; Pardo, L.A. The EAG Voltage-Dependent K⁺ Channel Subfamily: Similarities and Differences in Structural Organization and Gating. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 411. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Napp, J.; Monje, F.; Stühmer, W.; Pardo, L.A. Glycosylation of Eag1 (Kv10.1) Potassium Channels: Intracellular Trafficking and Functional Consequences. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 29506–29512. [[CrossRef](#)]
24. Pardo, L.A.; Del Camino, D.; Sánchez, A.; Alves, F.; Brüggemann, A.; Beckh, S.; Stühmer, W. Oncogenic Potential of EAG K⁺ Channels. *EMBO J.* **1999**, *18*, 5540–5547. [[CrossRef](#)]
25. Gomes, F.R.; Romaniello, V.; Sánchez, A.; Weber, C.; Narayanan, P.; Psol, M.; Pardo, L.A. Alternatively Spliced Isoforms of KV10.1 Potassium Channels Modulate Channel Properties and Can Activate Cyclin-Dependent Kinase in Xenopus Oocytes. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 30351–30365. [[CrossRef](#)]
26. Loza-Huerta, A.; Milo, E.; Picones, A.; Hernández-Cruz, A.; Luis, E. Thallium-Sensitive Fluorescent Assay Reveals Loperamide as a New Inhibitor of the Potassium Channel Kv10.1. *Pharmacol. Reports* **2021**, *73*, 1744–1753. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Toplak, Ž.; Hendrickx, L.A.; Abdelaziz, R.; Shi, X.; Peigneur, S.; Tomašič, T.; Tytgat, J.; Peterlin-Mašič, L.; Pardo, L.A. Overcoming Challenges of HERG Potassium Channel Liability through Rational Design: Eag1 Inhibitors for Cancer Treatment. *Med. Res. Rev.* **2022**, *42*, 183–226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. García-Ferreiro, R.E.; Kerschensteiner, D.; Major, F.; Monje, F.; Stühmer, W.; Pardo, L.A. Mechanism of Block of HEag1 K⁺ Channels by Imipramine and Astemizole. *J. Gen. Physiol.* **2004**, *124*, 301–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Muyldermans, S. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annu. Rev. Biochem.* **2013**, *82*, 775–797. [[CrossRef](#)]
30. Hernandez-Resendiz, I.; Hartung, F.; Pardo, L.A. Antibodies Targeting KVPotassium Channels: A Promising Treatment for Cancer. *Bioelectricity* **2019**, *1*, 180–187. [[CrossRef](#)]
31. Gómez-Varela, D.; Zwick-Wallasch, E.; Knötgen, H.; Sánchez, A.; Hettmann, T.; Ossipov, D.; Weseloh, R.; Contreras-Jurado, C.; Rothe, M.; Stühmer, W.; et al. Monoclonal Antibody Blockade of the Human Eag1 Potassium Channel Function Exerts Antitumor Activity. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 7343–7349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Hartung, F.; Krüwel, T.; Shi, X.; Pfizenmaier, K.; Kontermann, R.; Chames, P.; Alves, F.; Pardo, L.A. A Novel Anti-Kv10.1 Nanobody Fused to Single-Chain TRAIL Enhances Apoptosis Induction in Cancer Cells. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Chen, Y.; Sánchez, A.; Rubio, M.E.; Kohl, T.; Pardo, L.A.; Stühmer, W. Functional KV10.1 Channels Localize to the Inner Nuclear Membrane. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e19257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Ninkovic, M.; Mitkovski, M.; Kohl, T.; Stühmer, W.; Pardo, L.A. Physical and Functional Interaction of KV10.1 with Rabaptin-5 Impacts Ion Channel Trafficking. *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 3077–3084. [[CrossRef](#)]
35. Sánchez, A.; Urrego, D.; Pardo, L.A. Cyclic Expression of the Voltage-gated Potassium Channel Kv10.1 Promotes Disassembly of the Primary Cilium. *EMBO Rep.* **2016**, *17*, 708–723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Mortensen, L.S.; Schmidt, H.; Farsi, Z.; Barrantes-Freer, A.; Rubio, M.E.; Ufartes, R.; Eilers, J.; Sakaba, T.; Stühmer, W.; Pardo, L.A. KV10.1 Opposes Activity-Dependent Increase in Ca²⁺ Influx into the Presynaptic Terminal of the Parallel Fibre-Purkinje Cell Synapse. *J. Physiol.* **2015**, *593*, 181–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Ludwig, J.; Weseloh, R.; Karschin, C.; Liu, Q.; Netzer, R.; Engeland, B.; Stansfeld, C.; Pongs, O. Cloning and Functional Expression of Rat Eag2, a New Member of the Ether-à-Go-Go Family of Potassium Channels and Comparison of Its Distribution with That of Eag1. *Mol. Cell. Neurosci.* **2000**, *16*, 59–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Bijlenga, P.; Occhiodoro, T.; Liu, J.H.; Bader, C.R.; Bernheim, L.; Fischer-Lougheed, J. An Ether-a-Go-Go K⁺ Current, I(h-Eag), Contributes to the Hyperpolarization of Human Fusion-Competent Myoblasts. *J. Physiol.* **1998**, *512*, 317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

39. Ramírez, A.; Hinojosa, L.M.; Gonzales, J.D.J.; Montante-Montes, D.; Martínez-Benítez, B.; Aguilar-Guadarrama, R.; Gamboa-Domínguez, A.; Morales, F.; Carrillo-García, A.; Lizano, M.; et al. KCNH1 Potassium Channels Are Expressed in Cervical Cytologies from Pregnant Patients and Are Regulated by Progesterone. *Reproduction* **2013**, *146*, 615–623. [[CrossRef](#)]
40. Urrego, D.; Movsisyan, N.; Ufartes, R.; Pardo, L.A. Periodic Expression of Kv10.1 Driven by PRb/E2F1 Contributes to G2/M Progression of Cancer and Non-Transformed Cells. *Cell Cycle* **2016**, *15*, 799–811. [[CrossRef](#)]
41. Hemmerlein, B.; Weseloh, R.M.; de Queiroz, F.M.; Knötgen, H.; Sánchez, A.; Rubio, M.E.; Martin, S.; Schliephacke, T.; Jenke, M.; Heinz-Joachim-Radzun; et al. Overexpression of Eag1 Potassium Channels in Clinical Tumours. *Mol. Cancer* **2006**, *5*, 41. [[CrossRef](#)]
42. de Queiroz, F.M.; Suarez-Kurtz, G.; Stühmer, W.; Pardo, L.A. Ether à Go-Go Potassium Channel Expression in Soft Tissue Sarcoma Patients. *Mol. Cancer* **2006**, *5*, 42. [[CrossRef](#)]
43. Asher, V.; Khan, R.; Warren, A.; Shaw, R.; Schalkwyk, G.V.; Bali, A.; Sowter, H.M. The Eag Potassium Channel as a New Prognostic Marker in Ovarian Cancer. *Diagn. Pathol.* **2010**, *5*, 78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Agarwal, J.R.; Griesinger, F.; Stühmer, W.; Pardo, L.A. The Potassium Channel Ether à Go-Go Is a Novel Prognostic Factor with Functional Relevance in Acute Myeloid Leukemia. *Mol. Cancer* **2010**, *9*, 18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Ding, X.W.; Wang, X.G.; Luo, H.S.; Tan, S.Y.; Gao, S.; Luo, B.; Jiang, H. Expression and Prognostic Roles of Eag1 in Resected Esophageal Squamous Cell Carcinomas. *Dig. Dis. Sci.* **2008**, *53*, 2039–2044. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Ding, X.W.; Luo, H.S.; Jin, X.; Yan, J.J.; Ai, Y.W. Aberrant Expression of Eag1 Potassium Channels in Gastric Cancer Patients and Cell Lines. *Med. Oncol.* **2007**, *24*, 345–350. [[CrossRef](#)]
47. Menéndez, S.T.; Villaronga, M.Á.; Rodrigo, J.P.; Álvarez-Teijeiro, S.; García-Carracedo, D.; Urduñigo, R.G.; Fraga, M.F.; Pardo, L.A.; Vilorio, C.G.; Suárez, C.; et al. Frequent Aberrant Expression of the Human Ether à Go-Go (HEAG1) Potassium Channel in Head and Neck Cancer: Pathobiological Mechanisms and Clinical Implications. *J. Mol. Med.* **2012**, *90*, 1173–1184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Wadhwa, S.; Wadhwa, P.; Dinda, A.K.; Gupta, N.P. Differential Expression of Potassium Ion Channels in Human Renal Cell Carcinoma. *Int. Urol. Nephrol.* **2009**, *41*, 251–257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Bernal-Ramos, G.; Hernández-Gallegos, E.; Vera, E.; Chávez-López, M.; Zúñiga-García, V.; Sánchez-Pérez, Y.; Garrido, E.; Camacho, J. Astemizole Inhibits Cell Proliferation in Human Prostate Tumorigenic Cells Expressing Ether À-Go-Go-1 Potassium Channels. *Cell. Mol. Biol.* **2017**, *63*, 11–13. [[CrossRef](#)]
50. García-Becerra, R.; Díaz, L.; Camacho, J.; Barrera, D.; Ordaz-Rosado, D.; Morales, A.; Ortiz, C.S.; Avila, E.; Bargallo, E.; Arrecillas, M.; et al. Calcitriol Inhibits Ether-à Go-Go Potassium Channel Expression and Cell Proliferation in Human Breast Cancer Cells. *Exp. Cell Res.* **2010**, *316*, 433–442. [[CrossRef](#)]
51. Weber, C.; De Queiroz, F.M.; Downie, B.R.; Suckow, A.; Stühmer, W.; Pardo, L.A. Silencing the Activity and Proliferative Properties of the Human Eag1 Potassium Channel by RNA Interference. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 13030–13037. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Downie, B.R.; Sánchez, A.; Knötgen, H.; Contreras-Jurado, C.; Gymnopoulos, M.; Weber, C.; Stühmer, W.; Pardo, L.A. Eag1 Expression Interferes with Hypoxia Homeostasis and Induces Angiogenesis in Tumors. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 36234–36240. [[CrossRef](#)]
53. Hui, C.; Lan, Z.; Yue-Li, L.; Li-Lin, H.; Li-Lin, H. Knockdown of Eag1 Expression by RNA Interference Increases Chemosensitivity to Cisplatin in Ovarian Cancer Cells. *Reprod. Sci.* **2015**, *22*, 1618–1626. [[CrossRef](#)]
54. Bai, Y.; Liao, H.; Liu, T.; Zeng, X.; Xiao, F.; Luo, L.; Guo, H.; Guo, L. MiR-296-3p Regulates Cell Growth and Multi-Drug Resistance of Human Glioblastoma by Targeting Ether-à-Go-Go (EAG1). *Eur. J. Cancer* **2013**, *49*, 710–724. [[CrossRef](#)]
55. Luis, E.; Lara Figueroa, C.O.; Durán Pastén, M.L.; Azorín Vega, E.P. Role of Gamma Radiation on Functional Expression of the Voltage-Gated Potassium Channel Kv10.1 and Its Importance in the Radiobiological Response. *Appl. Radiat. Isot.* **2022**, *187*, 110331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Chandrashekar, D.S.; Basha, B.; Balasubramanya, S.A.H.; Creighton, C.J.; Ponce-Rodriguez, I.; Chakravarthi, B.V.S.K.; Varambally, S. UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses. *Neoplasia (United States)* **2017**, *19*, 649–658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Ousingsawat, J.; Spitzner, M.; Puntheeranurak, S.; Terracciano, L.; Tornillo, L.; Bubendorf, L.; Kunzelmann, K.; Schreiber, R. Expression of Voltage-Gated Potassium Channels in Human and Mouse Colonic Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 824–831. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Farias, L.M.B.; Ocaña, D.B.; Díaz, L.; Larrea, F.; Avila-Chávez, E.; Cadena, A.; Hinojosa, L.M.; Lara, G.; Villanueva, L.A.; Vargas, C.; et al. Ether à Go-Go Potassium Channels as Human Cervical Cancer Markers. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 6996–7001. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Ortiz, C.S.; Montante-Montes, D.; Saqui-Salces, M.; Hinojosa, L.M.; Gamboa-Domínguez, A.; Hernández-Gallegos, E.; Martínez-Benítez, B.; Solís-Pancoatl, M.D.R.; Garcia-Villa, E.; Ramírez, A.; et al. Eag1 Potassium Channels as Markers of Cervical Dysplasia. *Oncol. Rep.* **2011**, *26*, 1377–1383. [[CrossRef](#)]
60. Zheng, Y.Q.; Li, Z.J.; Gao, X.; Zhang, X.B.; Li, F.J.; Shi, Y.J.; Luo, G.; Li, W. Expression of Eag1 K(+) Channel in Prostate Cancer and Its Significance. *Zhonghua Nan Ke Xue* **2013**, *19*, 205–209.
61. Martínez, R.; Stühmer, W.; Martin, S.; Schell, J.; Reichmann, A.; Rohde, V.; Pardo, L. Analysis of the Expression of Kv10.1 Potassium Channel in Patients with Brain Metastases and Glioblastoma Multiforme: Impact on Survival. *BMC Cancer* **2015**, *15*, 839. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

62. Borowiec, A.-S.; Hague, F.; Harir, N.; Guénin, S.; Guerineau, F.; Gouilleux, F.; Roudbaraki, M.; Lassoued, K.; Ouadid-Ahidouch, H. IGF-1 Activates HEAG K⁺ Channels through an Akt-Dependent Signaling Pathway in Breast Cancer Cells: Role in Cell Proliferation. *J. Cell. Physiol.* **2007**, *212*, 690–701. [[CrossRef](#)]
63. Ouadid-Ahidouch, H.; Le Bourhis, X.; Roudbaraki, M.; Toillon, R.A.; Delcourt, P.; Prevarskaya, N. Changes in the K⁺ Current-Density of MCF-7 Cells during Progression through the Cell Cycle: Possible Involvement of a h-Ether.a-Gogo K⁺ Channel. *Recept. Channels* **2001**, *7*, 345–356.
64. Hammadi, M.; Chopin, V.; Matifat, F.; Dhennin-Duthille, I.; Chasseraud, M.; Sevestre, H.; Ouadid-Ahidouch, H. Human Ether À-Go-Go K⁺ Channel 1 (HEag1) Regulates MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Migration through Orai1-Dependent Calcium Entry. *J. Cell. Physiol.* **2012**, *227*, 3837–3846. [[CrossRef](#)]
65. Valdés-Abadía, B.; Morán-Zendejas, R.; Rangel-Flores, J.M.; Rodríguez-Menchaca, A.A. Chloroquine Inhibits Tumor-Related Kv10.1 Channel and Decreases Migration of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells in Vitro. *Eur. J. Pharmacol.* **2019**, *855*, 262–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Gavriloova-Ruch, O.; Schönherr, K.; Gessner, G.; Schönherr, R.; Klapperstück, T.; Wohlrab, W.; Heinemann, S.H. Effects of Imipramine on Ion Channels and Proliferation of IGR1 Melanoma Cells. *J. Membr. Biol.* **2002**, *188*, 137–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Sherr, C.J.; McCormick, F. The RB and P53 Pathways in Cancer. *Cancer Cell* **2002**, *2*, 103–112. [[CrossRef](#)]
68. Lin, H.; Li, Z.; Chen, C.; Luo, X.; Xiao, J.; Dong, D.; Lu, Y.; Yang, B.; Wang, Z. Transcriptional and Post-Transcriptional Mechanisms for Oncogenic Overexpression of Ether À Go-Go K⁺ Channel. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e20362. [[CrossRef](#)]
69. Moody, C.A.; Laimins, L.A. Human Papillomavirus Oncoproteins: Pathways to Transformation. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 550–560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Hosseinahli, N.; Aghapour, M.; Duijf, P.H.G.; Baradaran, B. Treating Cancer with MicroRNA Replacement Therapy: A Literature Review. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *233*, 5574–5588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Santoni, G.; Morelli, M.B.; Santoni, M.; Nabissi, M.; Marinelli, O.; Amantini, C. Targeting Transient Receptor Potential Channels by MicroRNAs Drives Tumor Development and Progression. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*; Springer Nature: Berlin/Heidelberg, Germany, 2020; Volume 1131.
72. Jiang, X.H.; Zhang, J.T.; Chan, H.C. Ion Channels/Transporters as Epigenetic Regulators?—A MicroRNA Perspective. *Sci. China Life Sci.* **2012**, *55*. [[CrossRef](#)]
73. Díaz, L.; Ceja-Ochoa, I.; Restrepo-Angulo, I.; Larrea, F.; Avila-Chávez, E.; García-Becerra, R.; Borja-Cacho, E.; Barrera, D.; Ahumada, E.; Gariglio, P.; et al. Estrogens and Human Papilloma Virus Oncogenes Regulate Human Ether-à-Go-Go-1 Potassium Channel Expression. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 3300–3307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Cázares-Ordoñez, V.; González-Duarte, R.J.; Díaz, L.; Ishizawa, M.; Uno, S.; Ortíz, V.; Ordoñez-Sánchez, M.L.; Makishima, M.; Larrea, F.; Avila, E. A Cis-Acting Element in the Promoter of Human Ether à Go-Go 1 Potassium Channel Gene Mediates Repression by Calcitriol in Human Cervical Cancer Cells. *Biochem. Cell Biol.* **2015**, *93*, 94–101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Kagohara, L.T.; Stein-O'Brien, G.L.; Kelley, D.; Flam, E.; Wick, H.C.; Danilova, L.V.; Easwaran, H.; Favorov, A.V.; Qian, J.; Gaykalova, D.A.; et al. Epigenetic Regulation of Gene Expression in Cancer: Techniques, Resources and Analysis. *Brief. Funct. Genom.* **2018**, *17*, 49–63. [[CrossRef](#)]
76. Liu, Z.; Zhang, J.; Gao, Y.; Pei, L.; Zhou, J.; Gu, L.; Zhang, L.; Zhu, B.; Hattori, N.; Ji, J.; et al. Large-Scale Characterization of DNA Methylation Changes in Human Gastric Carcinomas with and without Metastasis. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 4598–4612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Pulczinski, J.C.; Shang, Y.; Dao, T.; Limjunyawong, N.; Sun, Q.; Mitzner, W.; Cheng, R.Y.S.; Tang, W.Y. Multigenerational Epigenetic Regulation of Allergic Diseases: Utilizing an Experimental Dust Mite-Induced Asthma Model. *Front. Genet.* **2021**, *12*, 624561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Lamothe, S.M.; Zhang, S. Chapter Five—Ubiquitination of Ion Channels and Transporters. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; Volume 141.
79. Hsu, P.H.; Ma, Y.T.; Fang, Y.C.; Huang, J.J.; Gan, Y.L.; Chang, P.T.; Jow, G.M.; Tang, C.Y.; Jeng, C.J. Cullin 7 Mediates Proteasomal and Lysosomal Degradations of Rat Eag1 Potassium Channels. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 40825. [[CrossRef](#)]
80. Fang, Y.C.; Fu, S.J.; Hsu, P.H.; Chang, P.T.; Huang, J.J.; Chiu, Y.C.; Liao, Y.F.; Jow, G.M.; Tang, C.Y.; Jeng, C.J. Identification of MKRN1 as a Second E3 Ligase for Eag1 Potassium Channels Reveals Regulation via Differential Degradation. *J. Biol. Chem.* **2021**, *296*, 100484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Cerami, E.; Gao, J.; Dogrusoz, U.; Gross, B.E.; Sumer, S.O.; Aksoy, B.A.; Jacobsen, A.; Byrne, C.J.; Heuer, M.L.; Larsson, E.; et al. The CBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. *Cancer Discov.* **2012**, *2*, 401–404. [[CrossRef](#)]
82. Gao, J.; Aksoy, B.A.; Dogrusoz, U.; Dresdner, G.; Gross, B.; Sumer, S.O.; Sun, Y.; Jacobsen, A.; Sinha, R.; Larsson, E.; et al. Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the CBioPortal. *Sci. Signal.* **2013**, *6*, pl1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. GLOBOCAN. Cancer Today. IARC. 2020. Available online: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=asr&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10 (accessed on 25 July 2022).

84. Zito Marino, F.; Rocco, G.; Morabito, A.; Mignogna, C.; Intartaglia, M.; Liguori, G.; Botti, G.; Franco, R. A New Look at the ALK Gene in Cancer: Copy Number Gain and Amplification. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2016**, *16*, 493–502. [[CrossRef](#)]
85. Antolín, S.; García-Caballero, L.; Reboredo, C.; Molina, A.; Mosquera, J.; Vázquez-Boquete, Á.; Gallego, R.; Santiago, M.P.; Concha, Á.; Pérez, E.; et al. Is There a Correlation between HER2 Gene Amplification Level and Response to Neoadjuvant Treatment with Trastuzumab and Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer? *Virchows Arch.* **2021**, *479*, 853–857. [[CrossRef](#)]
86. Singh, J.C.; Jhaveri, K.; Esteva, F.J. HER2-Positive Advanced Breast Cancer: Optimizing Patient Outcomes and Opportunities for Drug Development. *Br. J. Cancer* **2014**, *111*, 1888–1898. [[CrossRef](#)]
87. Rosendo-Pineda, M.J.; Moreno, C.M.; Vaca, L. Role of Ion Channels during Cell Division. *Cell Calcium* **2020**, *91*, 102258. [[CrossRef](#)]
88. Rao, V.R.; Perez-Neut, M.; Kaja, S.; Gentile, S. Voltage-Gated Ion Channels in Cancer Cell Proliferation. *Cancers* **2015**, *7*, 849–875. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Cone, C.D. Unified Theory on the Basic Mechanism of Normal Mitotic Control and Oncogenesis. *J. Theor. Biol.* **1971**, *30*, 151–181. [[CrossRef](#)]
90. Wang, B.; Liang, Z.; Liu, P. Functional Aspects of Primary Cilium in Signaling, Assembly and Microenvironment in Cancer. *J. Cell. Physiol.* **2021**, *236*, 3207–3219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Napoli, G.; Panzironi, N.; Traversa, A.; Catalanotto, C.; Pace, V.; Petrizzelli, F.; Giovannetti, A.; Lazzari, S.; Cogoni, C.; Tartaglia, M.; et al. Potassium Channel KCNH1 Activating Variants Cause Altered Functional and Morphological Ciliogenesis. *Mol. Neurobiol.* **2022**, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Urrego, D.; Sánchez, A.; Tomczak, A.P.; Pardo, L.A. The Electric Fence to Cell-Cycle Progression: Do Local Changes in Membrane Potential Facilitate Disassembly of the Primary Cilium? *BioEssays* **2017**, *39*, 1600190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Delling, M.; Decaen, P.G.; Doerner, J.F.; Febvay, S.; Clapham, D.E. Primary Cilia Are Specialized Calcium Signalling Organelles. *Nature* **2013**, *504*, 311–314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Decaen, P.G.; Delling, M.; Vien, T.N.; Clapham, D.E. Direct Recording and Molecular Identification of the Calcium Channel of Primary Cilia. *Nature* **2013**, *504*, 315–318. [[CrossRef](#)]
95. Du, R.; Huang, C.; Liu, K.; Li, X.; Dong, Z. Targeting AURKA in Cancer: Molecular Mechanisms and Opportunities for Cancer Therapy. *Mol. Cancer* **2021**, *20*, 15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Movsisyan, N.; Pardo, L.A. Kv10.1 Regulates Microtubule Dynamics during Mitosis. *Cancers* **2020**, *12*, 2409. [[CrossRef](#)]
97. Garcin, C.; Straube, A. Microtubules in Cell Migration. *Essays Biochem.* **2019**, *63*, 471–499.
98. Pardo-Pastor, C.; Rubio-Moscardo, F.; Vogel-González, M.; Serra, S.A.; Afthinos, A.; Mrkonjic, S.; Destaing, O.; Abenza, J.F.; Fernández-Fernández, J.M.; Trepast, X.; et al. Piezo2 Channel Regulates RhoA and Actin Cytoskeleton to Promote Cell Mechanobiological Responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 1925–1930. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Peretti, M.; Badaoui, M.; Girault, A.; Van Gulick, L.; Mabilille, M.P.; Tebbakha, R.; Sevestre, H.; Morjani, H.; Ouadid-Ahidouch, H. Original Association of Ion Transporters Mediates the ECM-Induced Breast Cancer Cell Survival: Kv10.1-Orai1-SPCA2 Partnership. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1175. [[CrossRef](#)]
100. Herrmann, S.; Ninkovic, M.; Kohl, T.; Lörinczi, É.; Pardo, L.A. Cortactin Controls Surface Expression of the Voltage-Gated Potassium Channel KV10.1. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 44151–44163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Becchetti, A.; Petroni, G.; Arcangeli, A. Ion Channel Conformations Regulate Integrin-Dependent Signaling. *Trends Cell Biol.* **2019**, *29*, 298–307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Valbuena, S.; Lerma, J. Non-Canonical Signaling, the Hidden Life of Ligand-Gated Ion Channels. *Neuron* **2016**, *92*, 316–329. [[CrossRef](#)]
103. Hegle, A.P.; Marble, D.D.; Wilson, G.F. A Voltage-Driven Switch for Ion-Independent Signaling by Ether-à-Go-Go K⁺ Channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 2886–2891. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Badaoui, M.; Mimsy-Julienne, C.; Saby, C.; Van Gulick, L.; Peretti, M.; Jeannesson, P.; Morjani, H.; Ouadid-Ahidouch, H. Collagen Type 1 Promotes Survival of Human Breast Cancer Cells by Overexpressing Kv10.1 Potassium and Orai1 Calcium Channels through DDR1-Dependent Pathway. *Oncotarget* **2018**, *9*, 24653. [[CrossRef](#)]
105. Girault, A.; Peretti, M.; Badaoui, M.; Hémon, A.; Morjani, H.; Ouadid-Ahidouch, H. The N and C-Termini of SPCA2 Regulate Differently Kv10.1 Function: Role in the Collagen 1-Induced Breast Cancer Cell Survival. *Am. J. Cancer Res.* **2021**, *11*, 251.
106. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Hernández-Reséndiz, I.; Pacheu-Grau, D.; Sánchez, A.; Pardo, L.A. Inhibition of Kv10.1 Channels Sensitizes Mitochondria of Cancer Cells to Antimetabolic Agents. *Cancers* **2020**, *12*, 920. [[CrossRef](#)]
108. Roma-Rodrigues, C.; Mendes, R.; Baptista, P.V.; Fernandes, A.R. Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 840. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Boedtker, E.; Pedersen, S.F. The Acidic Tumor Microenvironment as a Driver of Cancer. *Annu. Rev. Physiol.* **2020**, *82*, 103–126. [[CrossRef](#)]
110. Damaghi, M.; Wojtkowiak, J.W.; Gillies, R.J. PH Sensing and Regulation in Cancer. *Front. Physiol.* **2013**, *4*, 370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Pethő, Z.; Najder, K.; Carvalho, T.; McMorrow, R.; Todesca, L.M.; Rugi, M.; Bulk, E.; Chan, A.; Löwik, C.W.G.M.; Reshkin, S.J.; et al. PH-Channeling in Cancer: How PH-Dependence of Cation Channels Shapes Cancer Pathophysiology. *Cancers* **2020**, *12*, 2484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

112. Kazmierczak, M.; Zhang, X.; Chen, B.; Mulkey, D.K.; Shi, Y.; Wagner, P.G.; Pivaroff-Ward, K.; Sassic, J.K.; Bayliss, D.A.; Jegla, T. External PH Modulates EAG Superfamily K⁺ Channels through EAG-Specific Acidic Residues in the Voltage Sensor. *J. Gen. Physiol.* **2013**, *141*, 721–735. [[CrossRef](#)]
113. Terlau, H.; Ludwig, J.; Steffan, R.; Pongs, O.; Stühmer, W.; Heinemann, S.H. Extracellular Mg²⁺ Regulates Activation of Rat Eag Potassium Channel. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **1996**, *432*, 301–312. [[CrossRef](#)]
114. Spitzner, M.; Ousingsawat, J.; Scheidt, K.; Kunzelmann, K.; Schreiber, R. Voltage-Gated K⁺ Channels Support Proliferation of Colonic Carcinoma Cells. *FASEB J.* **2007**, *21*, 35–44. [[CrossRef](#)]
115. Toral, C.; Mendoza-Garrido, M.E.; Azorín, E.; Hernández-Gallegos, E.; Gomora, J.C.; Delgadillo, D.M.; Solano-Agama, C.; Camacho, J. Effect of Extracellular Matrix on Adhesion, Viability, Actin Cytoskeleton and K⁺ Currents of Cells Expressing Human Ether à Go-Go Channels. *Life Sci.* **2007**, *81*, 255–265. [[CrossRef](#)]
116. Lai, Q.; Wang, T.; Guo, Q.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Yuan, L.; Ling, R.; He, Y.; Wang, W. Positive Correlation between the Expression of HEag1 and HIF-1 α in Breast Cancers: An Observational Study. *BMJ Open* **2014**, *4*, e005049. [[CrossRef](#)]
117. Santos, R.; Ursu, O.; Gaulton, A.; Bento, A.P.; Donadi, R.S.; Bologa, C.G.; Karlsson, A.; Al-Lazikani, B.; Hersey, A.; Oprea, T.I.; et al. A Comprehensive Map of Molecular Drug Targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 19–34. [[CrossRef](#)]
118. Kale, V.P.; Amin, S.G.; Pandey, M.K. Targeting Ion Channels for Cancer Therapy by Repurposing the Approved Drugs. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2015**, *1848*, 2747–2755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Tomasello, G.; Armenia, I.; Molla, G. The Protein Imager: A Full-Featured Online Molecular Viewer Interface with Server-Side HQ-Rendering Capabilities. *Bioinformatics* **2020**, *36*, 2909–2911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

EL SISTEMA NERVIOSO, UNA VÍCTIMA MÁS DEL SARS-COV-2^a

THE NERVOUS SYSTEM, ANOTHER VICTIM OF SARS-COV-2

PAULINA LEÓN SÁNCHEZ^b, ENOCH LUIS^{b c*}

Recibido 31-05-2022, aceptado 28-09-2022, versión final 05-12-2022

Artículo Revisión

RESUMEN: El COVID-19 es la enfermedad provocada por el SARS-CoV-2, el virus que desencadenó la instauración de medidas preventivas de confinamiento desde principios de 2020. En un inicio, se identificó a la proteína S del virus como la “llave” que, dada su gran afinidad por el receptor ACE2, promueve la entrada al cuerpo humano. ACE2 se encuentra expresado en diferentes tejidos, y por lo tanto, son más propensos a presentar alteraciones al estar expuestos al virus. En el encéfalo encontramos dos regiones con ACE2 altamente expresado: 1) el bulbo olfatorio, razón por la cual se sugiere que esto puede facilitar la entrada del virus hacia el SNC, e incluso se considera que explica la pérdida de olfato y 2) el tallo cerebral, que resulta de especial importancia porque el complejo Pre-Bötzinger se sitúa embebido en dicha estructura y regula el ritmo respiratorio mediante la coordinación de quimiorreceptores que sensan la saturación de O_2 y CO_2 , lo que da paso a un decremento en el suministro de oxígeno. Además, parte de las alteraciones en el SNP se piensa que se generan a partir de la interacción del virus con los nociceptores dando paso a síntomas como dolor muscular y de cabeza.

PALABRAS CLAVE: SARS-CoV-2; ACE2; cerebro; nociceptores; bulbo olfatorio.

ABSTRACT: COVID-19 is the name of sickness headed by SARS-CoV-2, which gated the confinement restrictions since March 2020. At the beginning the S protein was identified as the “key” that enhances entering human body, due to its affinity with ACE2 receptor. ACE2 receptor is known to be expressed in a variety of tissues in a manner in which that location increases their infection-probabilities in exposure to this virus. The brain contains two regions where ACE2 is mainly expressed: 1) The olfactory bulb which is thought to be involved in loss of smell and facilitating entering to the Central Nervous System, on the other hand 2) the brainstem keeps imbibed the Pre-Bötzinger complex, a mediator of respiratory rhythm, showed its implications in oxygen depletion because of abnormal working of O_2 , and CO_2 sensing chemoreceptors. In concern with PNS it is considered virus-nociceptors interaction as the most likely reason to muscular pain and headache.

KEYWORDS: SARS-CoV-2; ACE2; brain; nociceptors; olfactory bulb.

^aLeón-Sánchez, P. & Luis, E. (2023). El sistema nervioso, una víctima más del SARS-CoV-2. *Rev. Fac. Cienc.*, 12 (1), 77–84. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.fac.cienc.v12n1.102953>

^bLaboratorio Nacional de Canalopatías, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior s/n, C.U., Ciudad de México 04510, México

^cCátedras CONACYT - Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior s/n, C.U., Ciudad de México 04510, México

* Autor para correspondencia: enoch@ifc.unam.mx

1. INTRODUCCIÓN

Han transcurrido más de dos años desde que la pandemia causada por el COVID-19 nos mantuvo en confinamiento a nivel mundial. A la fecha se ha publicado una descomunal cantidad de estudios intentando descifrar los mecanismos de acción del virus causante de esta enfermedad, el SARS-CoV-2 (por sus siglas en inglés *severe acute respiratory syndrome*); sin embargo, aún queda una infinidad de preguntas por resolver, por lo que existe un fuerte interés en cuanto a los factores causantes de los síntomas comunes durante y posteriores al desarrollo de la enfermedad, especialmente aquellos que causan alteraciones en el Sistema Nervioso Central (SNC).

Al igual que otros coronavirus, la infección primaria del SARS-CoV-2 afecta el tracto respiratorio, causando ya sea una infección asintomática o bien, una variedad de síntomas que incluyen tos, fiebre, neumonía, falla respiratoria, y parte de los síntomas que indican alteraciones a nivel neurológico son dolor de cabeza, confusión, depresión, desórdenes sensoriales y neuromusculares, entre otros (Spudich & Avindra, 2022). De acuerdo con los datos presentados por la Organización Mundial de la Salud, hasta finales de mayo del 2022 el virus había contagiado a más de 527 millones de personas y producido la muerte de aproximadamente 6.2 millones en todo el mundo (World Health Organization COVID-19 Explorer, 2020).

Pero antes de profundizar más en este tema, se puntualizan las particularidades que se conocen hasta ahora de este agente patógeno. Se sabe que se trata de un virus cuyo material genético se compone de RNA (por sus siglas en inglés *ribonucleic acid*), es decir, material genético de cadena sencilla con una extensión aproximada de 26 – 35 Kilobases (Kb), y codifica para cuatro proteínas estructurales: la proteína E (por *envelope* en inglés), la proteína M (por *membrane* en inglés), la proteína S (llamada así por *Spike protein* en inglés que a su vez hace referencia a su forma de espícula) y la proteína formadora de la nucleocápside (N).

Es conveniente recordar a la proteína S como el caballo de Troya que dará inicio al ataque porque además de ser la responsable de la estructura en forma de “corona” del virus (Esakandari *et al.*, 2020), en diversos estudios se ha comprobado que actúa como una “llave maestra” que le permite tomar el control de la maquinaria celular de sus víctimas, o bien del hospedero (Baig *et al.*, 2020; McFarland *et al.*, 2021; Shiers *et al.*, 2020). Esto se debe a que está conformada por dos subunidades: la S1 que presenta mayor afinidad al receptor ACE2 (por sus siglas en inglés *Angiotensin-converting enzyme*) y la S2 que auxilia la formación de una invaginación en la membrana celular tras la unión del virus a los receptores ACE2 y es ahí cuando la misma tensión de la invaginación endocita la molécula vírica. En el proceso, se fusionan ambas membranas de manera que le es permitido el paso al material genético vírico y consecuentemente inicia la replicación de este (Sawa & Akaike, 2022).

En pocas palabras, la proteína S se logra “camuflar” entre una de las proteínas que el cuerpo humano expresa en condiciones normales de modo que actúa tal como si se tratase de la Angiotensina 2 y logra “burlar” el

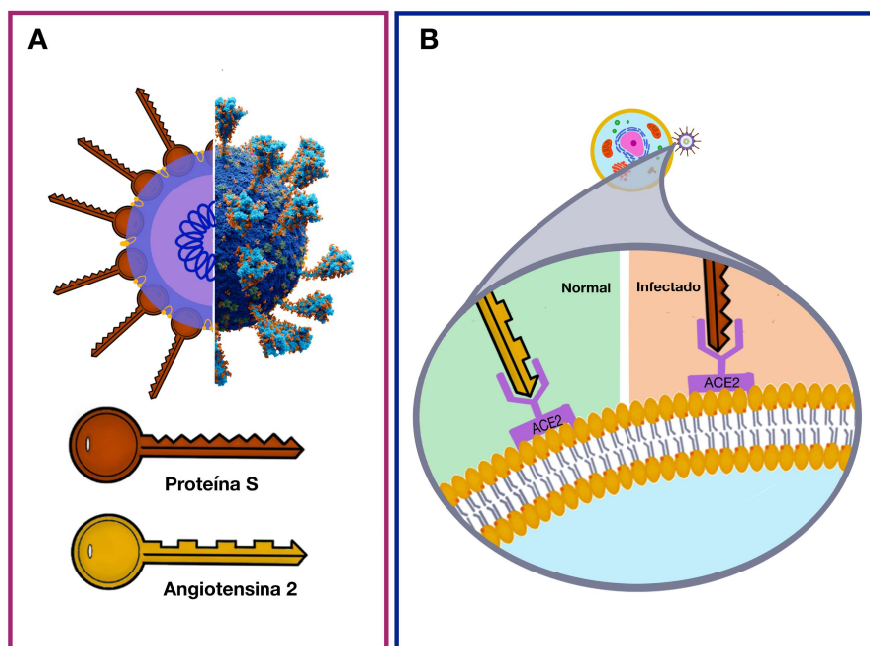


Figura 1: Esquema del SARS-CoV-2 y su interacción con las células del organismo huésped. En A, se representa cuan parecida puede ser la proteína S a la Angiotensina 2, lo que convierte a la primera en una llave maestra que permite al virus interactuar e ingresar a las células huésped. En B, esquema donde se muestra que la proteína S engaña a las células huésped al unirse directamente con el receptor ACE2. Fuente: Elaboración propia.

sistema al orillar a los receptores ACE2, que detectan la presencia de ésta, a unir su cerradura equívocamente con la “llave maestra” (Figura 1A). Lo que las células “no saben” es que este engaño es el presagio de una guerra, puesto que es así como consigue instalarse e invadir el interior de las células para comenzar a formar un ejército de SARS-CoV-2.

2. ¿CÓMO INVADE EL SARS-COV-2 AL SNC?

El SNC es aquel que controla y regula una infinidad de funciones, que a su vez involucran la integración y coordinación de funciones sistémicas, por lo que cada uno de los componentes que lo conforman debe estar propiamente resguardado y protegido de agentes que puedan intervenir en el cumplimiento de sus funciones. Por esa razón, existe una barrera que separa parcialmente el flujo sanguíneo del tejido nervioso. A esta barrera se le conoce como *Barrera Hematoencefálica* y presenta una conformación bien estructurada a tal grado que es capaz de frenar el avance de numerosas toxinas, bacterias y agentes víricos e incluso otras sustancias como medicamentos de libre circulación en el cuerpo; pero además, permite el paso selectivo de moléculas esenciales hacia el cerebro para llevar a cabo diferentes procesos homeostáticos. Se compone de cuatro tipos celulares: células endoteliales, pericitos, astrocitos –llamados así por su forma de estrella– y neuronas (Barichello *et al.*, 2019), (Figura 2).

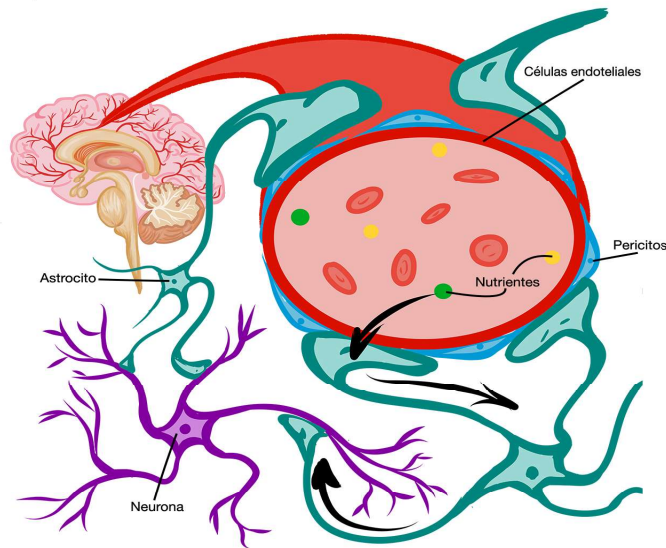


Figura 2: Disposición y composición de la barrera hematoencefálica, como se puede apreciar está compuesta por tipos celulares que contempla células endoteliales, pericitos, astrocitos y neuronas. Ilustración basada en Barichello et al. (2019). Fuente: Elaboración propia.

Pese a la complejidad de esta barrera, sorpresivamente se ha sugerido que ésta no basta para frenar la ruta invasiva del SARS-CoV-2 hacia el cerebro, ya que hasta el momento, se han propuesto diferentes mecanismos en los que el virus puede afectar a este órgano: en primera instancia, se piensa que la sobreexpresión de ACE2 en células del epitelio olfativo significa un atajo hacia el cerebro y de ahí puede dar inicio a la colonización hacia los tejidos que expresan el receptor blanco; en lo que respecta a la participación de la barrera hematoencefálica, se ha observado que su permeabilidad selectiva se ve alterada como resultado de procesos inflamatorios lo que a su vez, permite la entrada de agentes proinflamatorios que eventualmente pueden desencadenar un daño en el tejido neuronal. Además, parte de los componentes celulares de la barrera hematoencefálica (astrocitos, pericitos y algunas células endoteliales) expresan el receptor ACE2 (Alomari *et al.*, 2020; Hernandez *et al.*, 2021) lo que facilita la instalación del virus en esta zona.

Otros de los mecanismos que preocupan y que pueden ser los desencadenantes de manifestaciones clínicas que nos remiten a daños neuronales son aquellos que amenazan el suministro de O_2 al cerebro. Hasta el momento se han encontrado dos por lo que es conveniente abordarlos desde puntos de vista separados: por un lado, es sabido que uno de los síntomas característicos de la enfermedad es la inflamación en el tejido pulmonar y dada la liberación de tormentas de citoquinas, los alvéolos pueden llegar a colapsar y quedar inhabilitados para el intercambio gaseoso. Por otra parte, preocupa el hecho de que el receptor ACE2 se exprese en el complejo pre-Bötzinger que se localiza en el tallo cerebral y se encarga de coordinar el ritmo respiratorio, de tal forma que regula la periodicidad de los movimientos musculares que permiten la entrada

y correcta circulación del aire en función de la información que reciba de los quimiorreceptores sensibles a las concentraciones de O_2 y CO_2 circulantes en el torrente sanguíneo. De manera que al verse afectada la coordinación entre la ritmicidad respiratoria y la demanda de O_2 , es inevitable presentar una condición hipóxica, definida por una saturación de O_2 en sangre por debajo de 90% (Hernandez *et al.*, 2021; Hill *et al.*, 2012).

En lo que respecta a los síntomas asociados con funciones de cognición, en numerosos estudios se han percatado de que las personas con COVID-19 persistente, tienden a desarrollar problemas en la memoria de trabajo, dificultad para encontrar palabras al hablar, complicaciones para concentrarse que pueden derivar en confusión o neblina cerebral, entre otros (Bliddal *et al.*, 2021; Graham *et al.*, 2021). Es probable que parte de estos síntomas se desarrollen como consecuencia de la degradación de los recubrimientos de mielina, que según lo que señala Shabani (2021) se da como consecuencia de factores inflamatorios.

3. ¿Y QUÉ SUCEDE CON EL SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO (SNP)?

Es bien sabido que muchos tipos de virus pueden interactuar directamente con diversos tipos de neuronas sensoriales, ejemplos de estos pueden ser el virus de la rabia y el virus del herpes. Además, es conocido que muchas infecciones por patógenos tienden a producir dolor. Esto ha llevado a estudiar las interacciones de diversas bacterias y virus con los nociceptores, las neuronas sensoriales encargadas de responder a estímulos nocivos. Algunos autores sugieren que el SARS-CoV-2 puede interactuar con algunas poblaciones de nociceptores y que dicha interacción podría ser la causa de los síntomas característicos de la enfermedad tales como dolor de cabeza o dolor muscular. Shiers *et al.* (2020) identificaron a nivel de ARNm y proteína que existe una subpoblación de neuronas sensoriales que expresan el receptor ACE2, dichas neuronas además expresaban el gen del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CALCA), el gen del receptor purinérgico tipo 3 (P2RX3) y el gen del canal de sodio dependiente de voltaje 1.8 (SCN10A), lo que define a estas neuronas como nociceptores (Shiers *et al.*, 2020), por lo que podrían ser la puerta de entrada del SARS-CoV-2 al SNP. Además, existen ciertas estrategias de propagación en las que los nociceptores se ven involucrados en episodios severos de la enfermedad (Graham *et al.*, 2021; McFarland *et al.*, 2021).

4. DOLOR Y DEBILIDAD MUSCULAR DURANTE COVID-19 ¿EL SARS-COV-2 ES EL CULPABLE?

Se ha sugerido que tanto el dolor como la debilidad muscular pueden estar relacionados con la liberación de Interferones tipo I (Int-I), que son proteínas “de combate” que mandan las órdenes de ataque contra agentes patógenos, en su mayoría de tipo viral. En un inicio se pensaba que el carácter de Int-I tenía un efecto directo sobre la funcionalidad de los nociceptores; no obstante, más tarde se encontró que interactúan entre

sí mediante “soldados de bajo rango” –MNK1/2 (*Mitogen activated protein kinase interacting*)– que actúan como intermediarios entre Int-I y nociceptores. De manera que, si los Int-1 mandan un ataque, los MNK1/2 estimulan a los nociceptores llevándolos a un estado excitado ocasionando dolor de cabeza, cuerpo cortado y dolor en articulaciones (Khan *et al.*, 2021).

Sin embargo, también se ha observado que este virus presenta proteínas accesorias –nsp6, nsp13, ORF3B, ORF6– que funcionan como bloqueadores que entorpecen el combate al impedir la liberación de los Int-1 y ante este enfrentamiento, piden refuerzos y llaman al combate a las tropas de citoquinas que, en numerosas ocasiones son las responsables de la generación de una respuesta hiperinflamatoria, lo que podría derivar en un estado crítico de la enfermedad (McFarland *et al.*, 2021). También existe una segunda proteína de combate que coordina las batallas en el tejido muscular, a ésta se le conoce como Interleucina de tipo 6 y tal como sucede con Int-I, la Interleucina de tipo 6 desencadena la excitación de los nociceptores lo que se traduce en dolor muscular y coincide con ser uno de los síntomas que anuncia posibles complicaciones de la enfermedad (Ali *et al.*, 2021; McFarland *et al.*, 2021).

Un aspecto que ha adquirido mayor importancia es la presencia de debilidad muscular y se sospecha que al igual que otros coronavirus, el SARS-CoV-2 provoca una oleada de moléculas proinflamatorias que desencadenan la degradación de las láminas de mielina, que son recubrimientos generados por oligodendrocitos (en SNC) o por células de Schwann (en SNP) que facilitan la conductividad de la corriente eléctrica. Por este motivo es sabido que, de no estar este recubrimiento en buen estado, los axones de las neuronas que llevan las órdenes a los miocitos (células musculares) son propensos a presentar fugas de energía de manera análoga en la que un cable pelado conduce poca o deficiente corriente eléctrica generando una respuesta defectuosa que muy probablemente se puede traducir en debilidad muscular (McFarland *et al.*, 2021).

5. CONCLUSIONES

Ahora que se tiene un panorama más amplio de algunas de las tácticas de ataque del SARS-CoV-2 al sistema nervioso y cómo estos pueden afectar en procesos de neurorecepción, cognitivos, homeostáticos, entre otros, es pertinente mencionar que, pese a que se está trabajando a un ritmo acelerado en fármacos y vacunas para combatir y tratar el COVID-19, resulta de especial importancia atender las medidas de distanciamiento, el uso de cubrebocas así como la promoción de la vacunación, ya que lo mencionado en el presente escrito es sólo una muestra de lo que se conoce hasta el momento; sin embargo, las observaciones clínicas continúan arrojando nuevos síntomas y secuelas derivados de la enfermedad, incluso se sospecha que las personas que han contraído la enfermedad pueden adquirir mayor vulnerabilidad a desarrollar enfermedades neurodegenerativas como Parkinson o Alzheimer (Spudich & Avindra, 2022), pero aún existe un panorama incierto al respecto al considerar el amplio repertorio de síntomas asociado a las diferentes variantes.

Así mismo, conviene hacer hincapié en que la comprensión de las estrategias de infección del SARS-CoV-2 demanda un enfoque integral que requiere atención en diferentes factores de riesgo a nivel poblacional en función de condiciones ambientales, genéticas e incluso, socioeconómicas.

Contribución de los autores

Paulina León Sánchez realizó las figuras. Ambos autores escribieron y revisaron el manuscrito. Enoch Luis hizo la conceptualización del manuscrito.

Referencias

- Ali, A.M. & Kunugi, H. (2021). Skeletal Muscle Damage in COVID-19: A Call for Action. *Medicina* 57(4), 372. <https://doi.org/10.3390/medicina57040372>
- Alomari, S.O., Abou-Mrad, Z. & Bydon, A. (2020). COVID-19 and the central nervous system. *Clinical neurology and neurosurgery*, 198, 106116.
- Baig, A.M., Khaleeq, A., Ali, U. & Syeda, H. (2020). Evidence of the COVID-19 Virus Targeting the CNS: Tissue Distribution, Host-Virus Interaction, and Proposed Neurotropic Mechanisms. *ACS Chemical Neuroscience* 11(7), 995–998.
- Barichello, T., Collodel, A., Hasbun, R., & Morales, R. (2019). An Overview of the Blood- Brain Barrier. Eds. Blood-Brain Barrier. *Neuromethods*, 142. Humana Press, New York, NY., 1–8.
- Bliddal, S., Banasik, K., Pedersen, O.B., Nissen, I., Cantwell, L., Schwinn, M., Tulstrup, M., Westergaard, D., Ullum, H., Brunak, S., Tommerup, N., Feenstra, B., Geller, F., Ostrowski, S. R., Grønbæk, K., Nielsen, C.H., Nielsen, S.D. & Feldt-Rasmussen, U. (2021), Acute and persistent symptoms in non-hospitalized PCR-confirmed COVID- 19 patients. *Scientific Reports* 11, 13153.
- Esakandari, H., Nabi-afjadi, M., Fakkari-afjadi, J., Farahmandian, N., Miresmaeili, S. & Bahreini, E. (2020), A comprehensive review of COVID-19 characteristics. *Biological procedures online* 22(1), 1–10.
- Graham, E.L., Clark, J.R., Orban, Z.S., Lim, P.H., Szymanski, A.L., Taylor, C., Dibiasi, R. M., Tong Jia, D., Balabanov, R., Ho, S.U., Batra, A., Liotta, E.M. & Korálnik, I. J. (2021). Persistent neurologic symptoms and cognitive dysfunction in non- hospitalized Covid-19 “long haulers”. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 8(5), 1073–1085.
- Hernandez, V. S., Zetter, M. A., Guerra, E. C., Hernandez-Araiza, I., Karuzin, N., Hernandez-Perez, O.R., Eiden, L. E. & Zhang, L. (2021). ACE2 expression in rat brain implications for COVID-19 associated neurological manifestations. *Experimental Neurology* 345, 113837.

- Hill, R., A., Wyse, G. & Anderson, M. (2012). Aerobic and anaerobic forms of metabolism. In *Animal Physiology*. Eds. *Sinauer associates*, 183–206.
- Khan, S., Shafiei, M. S., Longoria, C., Schoggins, J.W., Savani, R.C. & Zaki, H. (2021). SARS-CoV-2 spike protein induces inflammation via TLR2-dependent activation of the NF-kB pathway. *ELife*, 10, e68563.
- McFarland, A.J., Yousuf, M.S., Shiers, S. & Price, T.J. (2021). Neurobiology of SARS- CoV-2 interactions with the peripheral nervous system: implications for COVID-19 and pain. *Pain reports*, 6(1), e885.
- Sawa, T. & Akaike, T. (2022). What triggers inflammation in COVID- 19?. *ELife*, 11:e76231.
- Spudich, S. & Avindra, N. (2022). Nervous system consequences of COVID-19. *Science*, 375(6578), 267–269.
- Shabani, Z. (2021), Demyelination as a result of an immune response in patients with COVID-19. *Acta Neurologica Belgica*, 121(4), 859–866.
- Shiers, S., Ray, P.R., Wangzhou, A., Sankaranarayanan, I., Tatsui, C.E., Rhines, L.D., Li, Y., Uhelski, M.L., Dougherty, P.M. & Price, T. J. (2020). ACE2 and SCARF expression in human dorsal root ganglion nociceptors: implications for SARS-CoV-2 virus neurological effects. *Pain*, 161(11), 2494–2501.
- World Health Organization COVID-19 Explorer (2020). Geneva: World Health Organization. [cited 2022 May 30]. <https://worldhealthorg.shinyapps.io/covid/>

Capítulo 2.

El cáncer desde la perspectiva canalocentrista

Paulina León Sánchez ¹, Esteban Gutiérrez García ¹ y Enoch Luis ^{1, 2}

¹Laboratorio Nacional de Canalopatías, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México

²Cátedras CONACYT - Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México

Cuando se menciona la palabra “cáncer” nos invaden historias, recuerdos, e incluso nuestros más profundos miedos. La posibilidad de que esta enfermedad pueda alcanzar a un ser querido resulta inquietante, pues muchos hemos vivido esta lucha, ya sea en primera o en tercera persona y en su mayoría, se conoce esta enfermedad desde el dolor ajeno. La letalidad de la enfermedad se debe –en gran medida– a la proliferación e invasividad desmedida de las células, lo que provoca un comportamiento inusitado que deja de lado el funcionamiento idóneo de los sistemas fisiológicos. Se ha sugerido que este comportamiento se da como una respuesta ante cambios en su material genético (Stratton *et al.*, 2009; Weinberg, 2014), lo que desencadena un mal funcionamiento en su metabolismo y regulación general. Sin embargo, esta idea podría resultar un tanto reduccionista al tomar en cuenta que el cáncer es una enfermedad que se debe estudiar desde una visión multidisciplinaria (Smye & Frangi, 2021), lo que indica que no todo

está en los genes, sino que también resulta fundamental estudiar las interacciones entre los diferentes componentes celulares, por ejemplo, los complejos proteicos que se conocen como canales iónicos.

De acuerdo con la *World Health Organization* (WHO, 2019), el cáncer ocupa la segunda causa de muerte a nivel mundial con un aproximado de 9.6 millones de defunciones en 2018, por lo que no resulta inesperado el hecho de que en 2020 se registraran 108,743 en México; el 8 % de los casos se dio a consecuencia de tumores malignos (INEGI, 2020). No obstante, al tratarse de un país de economía emergente, el panorama de la esperanza de vida cambia notablemente con respecto a los países desarrollados. Específicamente, el estado de Puebla, pese a no ocupar los primeros lugares de incidencia de cualquier tipo de cáncer a nivel estatal, ocupa un lugar intermedio de cáncer de mama (INEGI, 2020), aunado a esto, se ha visto un incremento del cáncer infantil en los últimos años (Baños *et al.*, 2020).

Los registros más antiguos sobre el cáncer datan del año 1500 a.C., en Egipto, sin embargo, fue reconocida como enfermedad hasta el nombramiento de Hipócrates de Kos en el siglo V a.C (Faguet, 2015). Desde entonces, ya se practicaban tratamientos basados en aceites, infusiones, entre otros. Muchos siglos más tarde se introdujeron tratamientos modernos pensados a partir de principios físicos y químicos, y con ello arrancó una carrera exhaustiva en pro de combatir este padecimiento. Pese a la incesante búsqueda, resulta desafortunado que gran parte de los tratamientos que ya se han puesto en práctica en el ámbito clínico han significado un batallón que sacrifica la salud mediante cirugías, radiación o quimioterapias, a cambio de reducir las posibilidades de propagación del tejido canceroso. Es por ello que los esfuerzos por llegar al entendimiento de dicha afección se han incrementado y se han diversificado los enfoques de abordaje, ya sea desde inmunología, biología molecular, biología celular, entre otros. Incluso dentro de estas áreas hay enfoques más específicos tales como el monitoreo de rutas metabólicas involucradas en el proceso carcinogénico, del impacto de la interacción entre genes y ambiente, del comportamiento o expresión aberrante de proteínas, entre otros.

Cualquier sistema biológico demanda la participación de mecanismos que permitan la entrada de nutrientes al igual que la excreción de desechos. Las células que componen el cuerpo humano, como la de cualquier otro organismo, ya sea multicelular o unicelular, nece-

sitan de estas vías de salida y entrada para que se de este intercambio (Alberts *et al.*, 2014). Es pertinente destacar que no todo lo que entra en la célula son nutrientes y no todo lo que sale son desechos, sino que también hay moléculas que juegan roles alternativos y que no por ello dejan de ser fundamentales, tales como los iones. Los iones son elementos con carga y al encontrarse en constante movimiento necesitan un paso a través de la membrana, es decir, “túneles”; esto es una idea simple para entender lo que es un canal iónico. Sin embargo, no son simples poros en la membrana, sino que su estructura es más compleja, y no necesariamente está abierta todo el tiempo permitiendo el paso de iones. Además, resulta interesante el hecho de que la diversificación de los canales iónicos radica en la selectividad hacia los distintos iones, así como en los diferentes mecanismos de activación (Aidley & Stanfield, 1996; Hille, 2001; Prevarskaya *et al.*, 2018).

Los canales iónicos participan en procesos celulares a partir de 1) la movilización de los iones que transitan a través de ellos y promueven ciertas vías de señalización dentro de la célula y 2) la interacción directa con otras moléculas o proteínas, incluso sin necesidad de que el canal permita el paso de iones. Un mal funcionamiento de este tipo de complejos proteicos resulta en diferentes enfermedades mejor conocidas como canalopatías (Jarzembowski, 2014). Por su parte, el cáncer es una patología que tiene su origen en la inestabilidad del material genético, el cual produce mutaciones que pueden afectar directamente

a los genes o a las zonas que regulan su expresión; los genes que codifican para canales iónicos no están exentos de sufrir estas alteraciones. Esto se comprobó en investigaciones realizadas a finales de los años 80 y a principios de los 90, cuando mostraron la relación que existe entre los canales iónicos y la progresión maligna del cáncer (Cone & Tongier, 1971; Hanahan & Weinberg, 2011).

Anteriormente, se pensaba que las canalopatías estaban determinadas por alguna mutación que afectaba las propiedades biofísicas de los canales iónicos. No obstante, el cáncer desafió la concepción que se tenía del término canalopatía, debido a que la expresión anómala de canales iónicos “sanos” participaba en el desarrollo de las propiedades distintivas del cáncer (*hallmarks of cancer*) (Hanahan & Weinberg, 2011; Prevarskaya *et al.*, 2018), lo que dio origen a los términos “oncocanalopatías” y “canales iónicos oncogénicos”. En años más recientes, la injerencia de los canales iónicos en el cáncer se puso de manifiesto cuando, a través de ensayos farmacológicos que usaban inhibidores de estos (Lang & Stournaras, 2014) o con el uso de animales modificados genéticamente (con carencia de algún gen que codificara para estos), alguna propiedad cancerígena se veía disminuida (Ufartes *et al.*, 2013).

¿Qué hacen los canales oncogénicos para promover el desarrollo del cáncer?

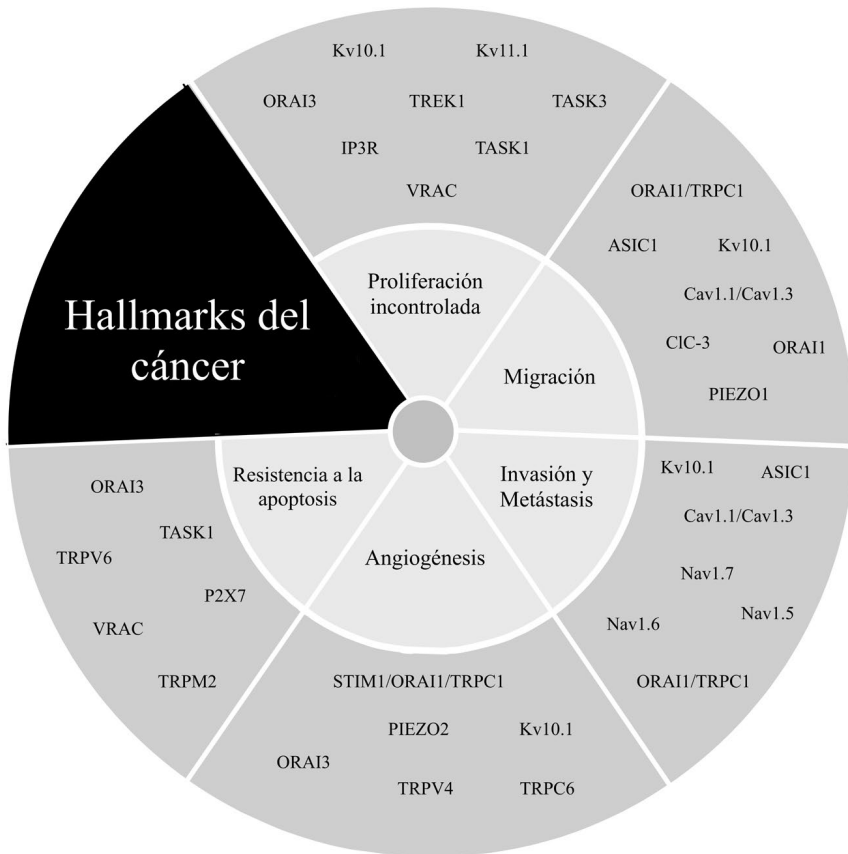
Se han descrito seis habilidades que las células cancerosas desarrollan, las cuales auxilian el progreso de la enfermedad. Dichos mecanismos comprenden:

- 1) resistencia a la muerte celular (apoptosis),
- 2) auto-suficiencia en señales de crecimiento,
- 3) evasión de la acción de moléculas liberadas en pro de la supresión de crecimiento,
- 4) invasividad y metástasis, comprendida como la dispersión de células cancerosas por el torrente sanguíneo (este último mecanismo es el responsable de la colonización del cáncer en tejidos distintos al órgano en donde se originó inicialmente),
- 5) inducción de angiogénesis, es decir, los tumores promueven el desarrollo de vasos sanguíneos para acarrear nutrientes que provienen del flujo sanguíneo, dirigiéndolos hacia los cúmulos de células cancerosas, e
- 6) inmortalidad replicativa (Hanahan & Weinberg, 2000) .

En los siguientes apartados se describe y se ahonda sobre el mecanismo de la expresión anómala de canales iónicos que juega un papel importante en dichas propiedades distintivas de células cancerígenas. Cabe destacar que la participación de los canales iónicos en los procesos de carcinogénesis y en general en el desarrollo de las propiedades dis-

tintivas del cáncer es variable y tanto su actividad como su presencia pueden verse alteradas en función del tipo de cáncer. Sin embargo, tal como se muestra en la Figura 1, se ha visto que los canales que por lo general apoyan la ejecución de dichas propiedades son los canales de potasio (K^+), calcio (Ca^{+2}), sodio (Na^+) y en menor cantidad de cloro (Cl^-).

Figura 1. Canales iónicos y su participación en el progreso del cáncer.



En la figura se muestran algunos de los canales iónicos que intervienen en el desarrollo de las propiedades distintivas del cáncer.

Resistencia a la muerte celular

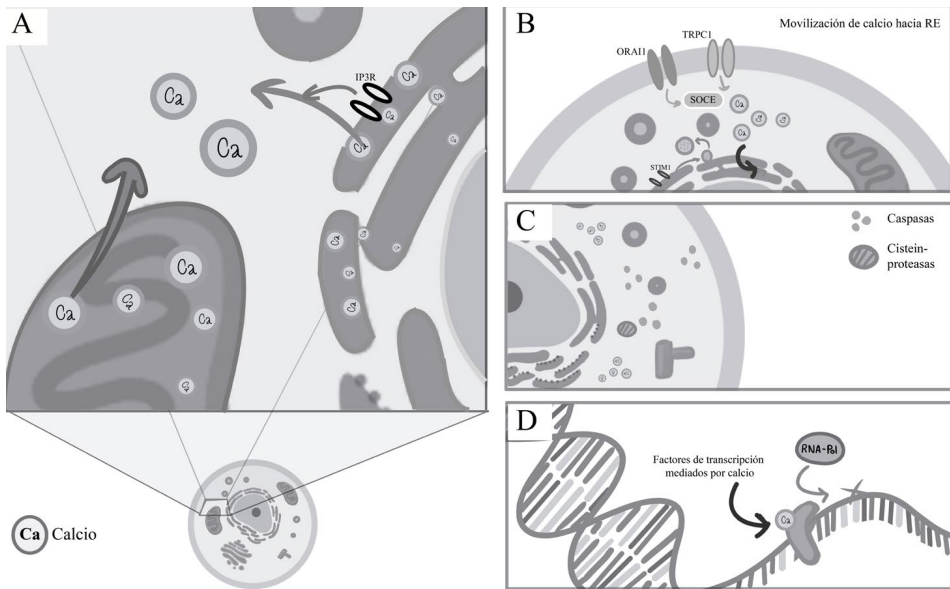
La apoptosis o muerte celular programada es un fenómeno homeostático mediante el cual el organismo se deshace de células dañadas o que han completado su ciclo de vida (Alberts *et al.*, 2014). La apoptosis puede ser desencadenada por múltiples factores. Uno de los más conocidos es debido a un incremento masivo del calcio citosólico (proveniente de compartimientos intracelulares o bien del exterior celular) y la incapacidad de las células para lidiar con este incremento, lo que inicia los mecanismos celulares de muerte celular, incluyendo la activación de caspasas o cistein-proteasas (Dane-se *et al.*, 2021). Tanto la movilización del calcio como sus concentraciones en los diferentes compartimentos dependen de la expresión de diferentes canales tales como canales de calcio activados por voltaje (Cav), canales activados por ligando, canales de calcio activados por liberación de calcio (CRAC, por sus siglas en inglés), canales catiónicos inespecíficos o por receptores de potencial transitorio (TRP, por sus siglas en inglés), etc. (Figura 2). Así, para que las células cancerígenas resistan a la apoptosis necesitan contar con los mecanismos que impidan el incremento masivo de calcio citosólico, así como mecanismos de resistencia si esto sucede.

De acuerdo con diferentes investigaciones, la resistencia a la apoptosis se ve favorecida por la remodelación homeostática en las concentraciones de calcio a través de una reducción en la expresión de canales permeables a este ion (por

ejemplo, TRPC1, TRPV6, TRPM2, etc.) y el vaciamiento de los almacenes intracelulares (Tajada & Villalobos, 2020). Las células de cáncer de colon consiguen manipular y reducir las concentraciones de Ca^{+2} citosólico mediante un incremento en la expresión del canal TRPC1 y una disminución en el retículo endoplásmico del receptor molecular de interacción estromal 2 (STIM2) (Sobradillo *et al.*, 2014). En esta misma vía, el silenciamiento genético de STIM2 hizo que las células normales fueran más resistentes a la apoptosis. Por su parte, se encontró que en células de cáncer prostático existe una disminución en la entrada de calcio debido a una reducción en la expresión del canal ORAI1, el cual se activa por el vaciamiento de calcio presente en almacenes intracelulares, lo que protege a dichas células de sufrir apoptosis (Flourakis *et al.*, 2010).

El rol de los canales de K^{+} en la apoptosis está aún en debate, aunque ciertos trabajos reportan un papel protector contra la apoptosis (Luis *et al.*, 2022; Prevarskaya *et al.*, 2018). En ese sentido, el canal de K^{+} del tipo K2P, TASK1, se encuentra incrementado en algunas líneas cancerígenas de pulmón, confiriéndoles mayor resistencia a la apoptosis; el silenciamiento genético del canal producía que dichas células incrementaran su apoptosis. Aunque el mecanismo anti-apoptótico conferido por la expresión del canal TASK-1 no está del todo claro, este parece interactuar con transportadores de nutrientes acoplados al ion sodio, los cuales se encuentra sobreexpresados en dichas células donde se realizaron los estudios (Leithner *et al.*, 2016).

Figura 2. Movilización del Calcio.



Entrada, almacenamiento y salida para la activación de diversos mecanismos.

- A) Movilización del calcio del lumen reticular hacia la mitocondria.
- B) Activación de vía ORAI/TRPC1/STIM1.
- C) Factores pro-apoptóticos dependientes de calcio.
- D) Participación del calcio en la expresión génica mediante la activación de factores de transcripción activados por calcio.

Proliferación incontrolada

La proliferación celular está relacionada con el ciclo celular, durante el cual la expresión de proteínas cambia de forma cíclica. De esta manera, los canales no solo son regulados durante el ciclo celular, sino que además son necesarios para que el ciclo pueda ocurrir. Hay suficiente evidencia de que los canales iónicos están involucrados en la proliferación celular de células sanas (Jin *et al.*, 2015; Movsisyan & Pardo, 2020), así que, si este proceso está alterado en las células cancerosas, lo más probable es que también lo esté su expresión y función (Hemmerlein *et al.*, 2006;

Yang *et al.*, 2020). Es factible suponer que el canal más importante en este apartado es el canal de potasio $K_v10.1$, un canal de K^+ activado por voltaje y que se encuentra expresado en alrededor del 70 % de los tipos de cáncer (Hemmerlein *et al.*, 2006; Ufartes *et al.*, 2013), que tiene una expresión cíclica durante el ciclo celular, con un incremento marcado durante la transición de la fase G2/M, justo antes de la iniciación de la mitosis (Sánchez *et al.*, 2016). La sobreexpresión del $K_v10.1$ hace que las células incrementen su tasa de proliferación, para que puedan crear tumores sólidos en cuestión de semanas (Pardo *et al.*, 1999).

Con base en lo antes mencionado, el canal Kv10.1 se ha considerado como un potencial biomarcador. Por lo tanto, los estudios en el área han redoblado esfuerzos para determinar los mecanismos en los que se ve involucrado. Parte de los frutos de estas investigaciones señalan que el canal Kv10.1 actúa mediante dos mecanismos: 1) Su expresión participa en la disociación de los cilios primarios. Este tipo de estructuras se presentan con frecuencia en células con una tasa de replicación elevada y se encargan de sensor las condiciones fisicoquímicas del espacio extracelular; la disociación entre el centriolo y el cilio de la célula madre desencadena una cadena de señalización que da paso a la replicación (Sánchez *et al.*, 2016). 2) La interacción de Kv10.1 con el canal ORAI1 incrementa la dinámica en las oscilaciones de las concentraciones de calcio intracelular lo que a su vez promueve el ensamblaje de la maquinaria celular, de manera que influye sobre la actividad del huso mitótico (microtúbulos). Asimismo, se ha visto que tiene un efecto catalítico sobre la separación de las cromátidas durante la anafase, de manera que su sobreexpresión incrementa notablemente la tasa de replicación, lo que da paso a la proliferación (Movsisyan & Pardo, 2020).

Se ha señalado que el proceso de proliferación también se ve incentivado por el incremento de las corrientes de Ca^{+2} , K^+ y Cl^- (generadas por los canales TRPC3, TRPC6, TRPV6, TRPM7, Cav2.3, Cav1; TASK-3, KCa, KATP, Kv, GIRK; CIC-3, respectivamente) que promueven un incremento en la sensibilidad hacia factores que favorecen la división celular (mitó-

genos) (Cone & Tongier, 1971; Prevarskaia *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2016). Además, se ha visto que en células de cáncer prostático el aumento de corrientes de Ca^{+2} generadas por los canales TRPM8 y Cav3 promueve un incremento en la producción de mitógenos, lo que evidencia el papel que tienen dichos canales con este comportamiento habitual en células cancerosas. Los canales activados por el inositol trifosfato (IP3R) son canales de calcio y se expresan principalmente en el retículo endoplásmico (Figura 2A). Estos canales liberan iones de calcio hacia el citosol. Reportes indican que, cuando este canal es inhibido, las células cancerosas mueren, mientras que las células sanas solo activan el proceso de autofagia que es la degradación de componentes celulares; es decir, estos canales son imprescindibles para las células cancerosas (Cárdenas *et al.*, 2010).

Migración y metástasis

La migración celular se asemeja al desplazamiento de tipo amebode, pues en este proceso las células se sirven de la interacción con la superficie donde se encuentren para avanzar, pero en el caso particular las células cancerosas ellas utilizan las interacciones con la matriz extracelular para migrar e invadir tejidos u órganos vecinos (Hanahan & Weinberg, 2000). Por su parte, la metástasis hace referencia al proceso mediante el cual las células cancerosas se dispersan desde un sitio primario –o lugar de origen– hasta tejidos secundarios (Pecorino, 2012). Además, en ambos procesos, la remodelación del citoesqueleto

es un proceso indispensable. Ejemplos del papel de canales iónicos en estos procesos celulares incluyen los reportes hechos en células de cáncer prostático, donde se ha observado la sobreexpresión del canal de potasio activado por Ca^{2+} (BKCa) y el cual posee un rol fundamental en los procesos de invasión y metástasis (Gambade *et al.*, 2016). Además de su papel como canal iónico (permitiendo el movimiento de iones K^+), se ha visto que el canal BKCa interactúa con integrinas de tipo $\alpha\text{v}\beta3$, de tal forma que este complejo promueve la fosforilación de las adhesiones focales mediante la activación de las quinasas de adhesión focal (FAK, por sus siglas en inglés) y con ello facilita el desplazamiento celular (Du *et al.*, 2016).

La familia de canales TRP ha sido descrita en diversos procesos sensoriales; pueden ser activados por múltiples estímulos (físicos o químicos), y permeables a diferentes cationes, entre ellos, el Ca^{2+} . Algunos canales TRP como el TRPC1, TRPC6, TRPC7 y TRPV2 han sido descritos como canales mecanosensibles, los cuales, se piensa, pueden ser activados por la presión mecánica generada por el crecimiento tumoral, lo que produce la entrada de calcio a las células y, en última instancia, activaría diversos procesos relacionados con el proceso carcinogénico. Se ha descrito que la activación del TRPC7 conduce a un incremento de Ca^{2+} citosólico, el cual produce la activación del canal de K^+ dependiente de calcio KCa1.1, con lo cual se favorece la migración y la invasión en cáncer de mama y prostático (Prevorskaya *et al.*, 2018).

El canal ORAI1 se sitúa en la membrana plasmática y participa en la remodelación de las concentraciones de calcio a través de la interacción con el STIM1, localizado en la membrana del retículo endoplasmático (Yeung *et al.*, 2020). Una sobreexpresión de ambos canales produce cambios en las concentraciones de calcio citoplasmático y parece ser que estas oscilaciones promueven la formación de adhesiones focales, filopodios, invadopodios y lamelipodios que son estructuras transitorias típicas de células en proceso de migración (Prevorskaya *et al.*, 2018). Algunas investigaciones han sugerido que este proceso podría estar mediado por las vías Rac y Ras-GTPasa que participan en la regulación de la actina en procesos de migración, división y quimiotaxis (Clayton & Ridley, 2020).

Angiogénesis

Además de proliferar sin restricción y de colonizar los tejidos con mecanismos complejos, las células cancerígenas son capaces de generar un microambiente para propiciar la continuidad del crecimiento tumoral. De hecho, algunos estudios sugieren que la remodelación de microambientes puede alterar la regulación en la expresión fenotípica (Hanahan, 2022). Esto sucede principalmente porque, al reproducirse a ritmos acelerados, las células cancerosas consumen todo el oxígeno y los nutrientes, lo que genera un ambiente con una concentración muy baja de oxígeno (hipoxia) y sin nutrientes. Aunque se esperaría que la respuesta a estas condiciones sea

la muerte de los tejidos, este momento es crucial para la activación de mecanismos para la protección de las células cancerosas; esta acción de protección se da con la liberación de factores de supervivencia, lo cual, en numerosos casos, es lo que otorga resistencia ante algunos de los tratamientos. Asimismo, estas células elevan su producción de energía mediante la degradación de glucosa (glucólisis); parte de los residuos resultantes de dicha transformación son protones (H^+), los cuales son expulsados al medio extracelular, favoreciendo la edificación de un microambiente con pH ácido. El estrés mecánico, la acidificación y la hipoxia son factores que promueven la angiogénesis.

El proceso de formación de nuevos capilares es necesario para mantener el crecimiento tumoral. Todos los tumores tienen cierto grado de hipoxia, lo que promueve la formación de capilares que distribuyen nutrientes, agua y oxígeno a las células que conforman el tumor (Muz *et al.*, 2015). Dentro de los mecanismos que promueven la angiogénesis se ha visto una relación directa con el aumento de corrientes de Ca^{+2} y K^+ , derivadas de la activación de los canales TRPC1, TRPC4, TRPC3, TRPC6, TRPM2, TRPM7, TRPM6, TRPV4, y Kv10.1, Kv11.1, $K_{Ca}3.1$, respectivamente, de manera que la actividad y movilización de ambos iones promueve la secreción de moléculas que potencian la vascularización de tejidos cancerosos (Prevarskaya *et al.*, 2010).

Entre las moléculas que promueven la angiogénesis, se encuentran los factores de crecimiento del endotelial vascular (VEFG, por sus siglas en inglés), los cuales parecen interactuar con canales TRP y con otros canales de calcio, los cuales promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos. Los VEFG pueden inducir angiogénesis a través de una vía clásica que involucra la activación de la fosfolipasa C y la producción de IP3 y diacilglicerol, con el subsecuente incremento de calcio intracelular. Sin embargo, diversos trabajos muestran que los VEFGs también pueden inducir la entrada de calcio a través de la activación de diferentes canales TRP (Smani *et al.*, 2018). De manera más particular, algunas publicaciones sugieren que el canal TRPC1 está estrechamente implicado en la angiogénesis, ya que experimentos muestran que, al suprimir el gen que codifica para este canal, la expresión de VEGF disminuye y, por lo tanto, el proceso de angiogénesis también (Wang *et al.*, 2009). Otro trabajo que reafirma el papel del canal Kv10.1 en cáncer fue el de Downie y colaboradores (2008), quienes propusieron que 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, uno de los factores que influyen la angiogénesis.

El pH en el ambiente tumoral

Una característica común en la mayoría de los tumores sólidos es que se desarrollan en microambientes ácidos, pequeñas regiones donde el pH extracelular es bajo. El pH fisiológico o el ideal para el correcto funcionamiento del organismo está entre 7.3-7.4, mientras que en los microambientes creados por los tumores se han descrito valores de pH entre 6.2 a 7.1 (Webb *et al.*, 2011), lo que favorece la actividad de múltiples proteinasas, cambios en la concentración de calcio citosólico y la activación de genes involucrados en la metástasis. Sin embargo, los mecanismos moleculares que permiten a las células tumorales detectar las disminuciones de pH, así como las vías de señalización activas en esas condiciones, no son claras.

Se ha sugerido que la acidificación del medio extracelular en etapas iniciales representa una fase crítica para el desarrollo de propiedades malignas relacionadas con la propagación del cáncer (Damaghi *et al.*, 2013). En este proceso intervienen canales de tipo ASIC (*Acid-Sensing Ion Channels*, por sus siglas en inglés). El canal ASIC1a, un canal que se activa por una acidificación del pH extracelular y el cual se ha especulado como un canal mecanosensible, incrementa su expresión en microambientes ácidos propios de tejidos cancerosos, cuya supresión se ha ligado con una reducción importante de la migración y metástasis (Jin *et al.*, 2015; Ruan *et al.*, 2021). También toma un papel relevante en la migración e invasividad de cáncer

hepático, esto se confirmó con ensayos funcionales en los que notaron la supresión de migración en células de carcinoma hepático con la delección del gen codificante para ASIC1a. Además, se observó que la expresión de ASIC1a se ve favorecida con la exposición a un ambiente extracelular con un pH de 6.5, lo que permite suponer que se trata de una retroalimentación positiva, en la que: 1) la acidez del microambiente promueve la expresión del canal, y 2) a su vez el incremento de los canales ASIC favorecen la acidificación del medio extracelular (Jin *et al.*, 2017).

¿Por qué un enfoque canalocentrista?

El uso de fármacos para contrarrestar el crecimiento tumoral se aplica en tratamientos de quimioterapia, pero no es el único en el que compuestos químicos se utilizan para tratar a las y los pacientes con cáncer. La terapia dirigida contra el cáncer se diferencia de la quimioterapia en que los compuestos usados en este último no tienen un blanco en específico y actúan mediante compuestos citotóxicos, mientras que los fármacos usados en la terapia dirigida tienen un blanco celular en particular (proteína, gen), el cual promueve que el cáncer progrese; de esta manera se busca que disminuya algún proceso celular, que por lo general es la proliferación, aunque también hay fármacos que pueden disminuir la migración, metástasis, angiogénesis u otros procesos. Hasta la fecha existen muchos fármacos aprobados para terapia dirigida contra el cáncer, pero ninguno tiene como blanco un canal iónico.

Tomando lo anterior en consideración, llega una pregunta fundamental: ¿por qué un enfoque canalocentrista?, hasta el momento, se ha visto que es indudable la participación de los canales iónicos en el desarrollo, supervivencia y progreso de invasividad de los diferentes tipos de cáncer, por lo que verlo desde este punto de vista permite establecer nuevos blancos tanto de diagnóstico como de tratamiento. Con la gran evidencia que existe, se busca que los canales iónicos formen parte de esta gran gama de moléculas blanco, pues son convenientes debido a que la mayoría están expresados en la membrana plasmática y tienen regiones expuestas al ambiente extracelular, por lo que son más accesibles que los blancos intracelulares. Otra ventaja que tienen los canales iónicos es que cuando estos promueven el cáncer, por lo general, se encuentran sobreexpresados en las células tumorales, por lo tanto, son candidatos ideales como blancos farmacológicos, ya que de esta manera el fármaco solo se une a las células que se quieren tratar sin dañar tejido sano y reduciendo los efectos secundarios.

Conclusiones y perspectivas a futuro

Como se describió a lo largo del capítulo, los canales iónicos son sumamente versátiles en lo que respecta a los mecanismos de promoción de características cancerígenas, es por ello que se han postulado como blancos potenciales para terapia dirigida. A pesar de los avances en el conocimiento de un amplio número de canales iónicos que participan en el desarrollo y evolución de las propiedades distintivas del cáncer, hacen falta investigaciones en torno a las rutas y vías de señalización involucradas, así como de moléculas que modulen canales iónicos específicos.

Agradecimientos.

Al CONACYT por el apoyo al proyecto de Ciencia Básica 2017-2018-A1-S-13646. De este apoyo se otorgó una beca (número de registro 31246) para la estudiante Paulina León Sánchez. También al CONACYT por la beca de maestría 760679 a Esteban Gutiérrez García.

Referencias

- Aidley, D. J., & Stanfield, P. R. (1996). *Ion Channels: Molecules in Action*. Cambridge University Press.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2018). Part IV Internal Organization of the Cell. In *Molecular Biology of the Cell* (Sixth Edit). Garland Science. <https://doi.org/10.1201/9781315735368-10>
- Baños, R., Cruz, A. M., Axcál, G. R., Solís, S. S., Magali, V., Rocha, R., Sánchez, A. C. & Hernández, J. M. (2020). Cáncer en la infancia, niñez y la adolescencia en el estado de Puebla: Análisis situacional de salud durante el 2018 Informe final al 14 de octubre del 2020, UPAEP-ABP, 1-43.
- Cárdenas, C., Miller, R. A., Smith, I., Bui, T., Molgó, J., Müller, M., Vais, H., Cheung, K. H., Yang, J., Parker, I., Thompson, C. B., Birnbaum, M. J., Hallows, K. R., & Foskett, J. K. (2010). Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 receptor Ca²⁺ transfer to mitochondria. *Cell*, 142(2), 270-283. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.007>
- Clayton, N. S., & Ridley, A. J. (2020). Targeting Rho GTPase Signaling Networks in Cancer. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 222. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00222>
- Cone, C. D., Jr, & Tongier, M., Jr (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>
- Danese, A., Leo, S., Rimessi, A., Wieckowski, M. R., Fiorica, F., Giorgi, C., & Pinton, P. (2021). Cell death as a result of calcium signaling modulation: A cancer-centric prospective. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 1868(8), 119061. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.119061>
- Damaghi, M., Wojtkowiak, J. W., & Gillies, R. J. (2013). pH sensing and regulation in cancer. *Frontiers in physiology*, 4, 370. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00370>
- 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. *The Journal of biological chemistry*, 283(52), 36234-36240. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801830200>
- Du, C., Zheng, Z., Li, D., Chen, L., Li, N., Yi, X., Yang, Y., Guo, F., Liu, W., Xie, X., & Xie, M. (2016). BKCα promotes growth and metastasis of prostate cancer through facilitating the coupling between αvβ3 integrin and FAK. *Oncotarget*, 7(26), 40174-40188. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9559>
- Faguet G. B. (2015). A brief history of cancer: age-old milestones underlying our current knowledge database. *International journal of cancer*, 136(9), 2022-2036. <https://doi.org/10.1002/ijc.29134>

- Flourakis, M., Lehen'kyi, V., Beck, B., Raphaël, M., Vandenberghe, M., Abeele, F. V., Roudbaraki, M., Lepage, G., Mauroy, B., Romain, C., Shuba, Y., Skryma, R., & Prevarskaya, N. (2010). Orai1 contributes to the establishment of an apoptosis-resistant phenotype in prostate cancer cells. *Cell death & disease*, 1(9), e75. <https://doi.org/10.1038/cddis.2010.52>
- Gambade, A., Zreika, S., Guéguinou, M., Chourpa, I., Fromont, G., Bouchet, A. M., Burlaud-Gaillard, J., Potier-Cartereau, M., Roger, S., Aucagne, V., Chevalier, S., Vandier, C., Goupille, C., & Weber, G. (2016). Activation of TRPV2 and BKCa channels by the LL-37 enantiomers stimulates calcium entry and migration of cancer cells. *Oncotarget*, 7(17), 23785–23800. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8122>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanahan D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- 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). Chapter 1 Introduction. In *Ion Channels of Excitable Membranes* (Third Edit, pp. 1–22). Sinauer Associates, Inc. https://doi.org/10.1007/3-540-29623-9_5640
- Jarzembowski, J. A. (2014). Channelopathies. In *Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms* (p. 194). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.01516-1>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2020). Estadísticas a Propósito Del Día Mundial De La Lucha Contra El Cáncer De Mama (19 De octubre). *Comunicado De Prensa*, 462/20, 1/7.
- Jin, C., Ye, Q. H., Yuan, F. L., Gu, Y. L., Li, J. P., Shi, Y. H., Shen, X. M., Bo-Liu, & Lin, Z. H. (2015). Involvement of acid-sensing ion channel 1 α in hepatic carcinoma cell migration and invasion. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(6), 4309–4317. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3070-6>
- Jin, C., Yuan, F. L., Gu, Y. L., Li, X., Liu, M. F., Shen, X. M., Liu, B., & Zhu, M. Q. (2017). Over-expression of ASIC1a promotes proliferation via activation of the β -catenin/LEF-TCF axis and is associated with disease outcome in liver cancer. *Oncotarget*, 8(16), 25977–25988. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10774>

- Lang, F., & Stourmaras, C. (2014). Ion channels in cancer: future perspectives and clinical potential. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 369(1638), 20130108. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0108>
- Leithner, K., Hirschmugl, B., Li, Y., Tang, B., Papp, R., Nagaraj, C., Stacher, E., Stiegler, P., Lindenmann, J., Olschewski, A., Olschewski, H., & Hrzenjak, A. (2016). TASK-1 Regulates Apoptosis and Proliferation in a Subset of Non-Small Cell Lung Cancers. *PloS one*, 11(6), e0157453. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157453>
- Luis, E., Anaya-Hernández, A., León-Sánchez, P., & Durán-Pastén, M. L. (2022). The Kv10.1 Channel: A Promising Target in Cancer. *International journal of molecular sciences*, 23(15), 8458. <https://doi.org/10.3390/ijms23158458>
- Movsisyan, N., & Pardo, L. A. (2020). Kv10.1 Regulates Microtubule Dynamics during Mitosis. *Cancers*, 12(9), 2409. <https://doi.org/10.3390/cancers12092409>
- Muz, B., de la Puente, P., Azab, F., & Azab, A. K. (2015). The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckland, N.Z.)*, 3, 83–92. <https://doi.org/10.2147/HP.S93413>
- 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>
- Prevarskaya, N., Skryma, R., & Shuba, Y. (2010). Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends in molecular medicine*, 16(3), 107–121. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.01.005>
- Pecorino, L. (2021). Metastasis. In *Molecular Biology of Cancer. Mechanisms, Targets, and Therapeutics (5th Edition)*. Oxford University Press.
- 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>
- Ruan, N., Tribble, J., Peterson, A. M., Jiang, Q., Wang, J. Q., & Chu, X. P. (2021). Acid-Sensing Ion Channels and Mechanosensation. *International journal of molecular sciences*, 22(9), 4810. <https://doi.org/10.3390/ijms22094810>
- 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>
- Smani, T., Gómez, L. J., Regodon, S., Woodard, G. E., Siegfried, G., Khatib, A. M., & Rosado, J. A. (2018). TRP Channels in Angiogenesis and Other Endothelial Functions. *Frontiers in physiology*, 9, 1731. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01731>

- Smye, S. W., & Frangi, A. F. (2021). Interdisciplinary research: shaping the healthcare of the future. *Future healthcare journal*, 8(2), e218–e223. <https://doi.org/10.7861/fhj.2021-0025>
- Sobradillo, D., Hernández-Morales, M., Ubierna, D., Moyer, M. P., Núñez, L., & Villalobos, C. (2014). A reciprocal shift in transient receptor potential channel 1 (TRPC1) and stromal interaction molecule 2 (STIM2) contributes to Ca²⁺ remodeling and cancer hallmarks in colorectal carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry*, 289(42), 28765–28782. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.581678>
- Stratton, M. R., Campbell, P. J., & Futreal, P. A. (2009). The cancer genome. *Nature*, 458(7239), 719–724. <https://doi.org/10.1038/nature07943>
- Tajada, S., & Villalobos, C. (2020). Calcium Permeable Channels in Cancer Hallmarks. *Frontiers in pharmacology*, 11, 968. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00968>
- 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>
- Wang, B., Li, W., Meng, X., & Zou, F. (2009). Hypoxia up-regulates vascular endothelial growth factor in U-87 MG cells: involvement of TRPC1. *Neuroscience letters*, 459(3), 132–136. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.05.015>
- World Health Organization. (2019). *Cancer*. Recuperado de https://www.who.int/es/health-topics/cancer#tab=tab_1
- Webb, B. A., Chimenti, M., Jacobson, M. P., & Barber, D. L. (2011). Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nature reviews. Cancer*, 11(9), 671–677. <https://doi.org/10.1038/nrc3110>
- Weinberg, R. A. (2013). *The Biology of Cancer* (2nd Edition). W. W. Norton & Company.
- Yang, C., Zhu, Z., Ouyang, X., Yu, R., Wang, J., Ding, G., & Jiang, F. (2020). Overexpression of acid-sensing ion channel 1a (ASIC1a) promotes breast cancer cell proliferation, migration and invasion. *Translational cancer research*, 9(12), 7519–7530. <https://doi.org/10.21037/tcr-20-2115>
- Yeung, P. S., Yamashita, M., & Prakriya, M. (2020). Molecular basis of allosteric Orai1 channel activation by STIM1. *The Journal of physiology*, 598(9), 1707–1723. <https://doi.org/10.1113/JP276550>