



**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**REGULACIÓN DEL CANAL DE K⁺ EAG POR FACTORES
ASOCIADOS AL FENOTIPO TUMORAL EN CÉLULAS
SANAS Y CANCEROSAS**

M en C. Iván Augusto Restrepo Angulo

Directores de tesis:

Dr. Javier Camacho (Depto. Farmacología)

Dra. María Carmen Sánchez Torres (Depto. Biomedicina Molecular)

Agradecimientos

Agradezco a la maestra en ciencias Elisabeth Hernández Gallegos y la Bióloga Eunice Vera por su asistencia en los experimentos que implicaban el cultivo de células, patch clamp y cuantificación de mRNA. Agradezco a Guadalupe Montiel por su ayuda técnica. También agradezco a mis compañeros del laboratorio 13, por brindarme su amistad y su colaboración. Finalmente, deseo manifestar mi gratitud con el doctor Javier Camacho y la Dra. Carmen Sánchez Torres por sus consejos y guía durante este trabajo.

Tabla de contenido

Capítulo 1	
1.1 Generalidades.....	1
1.2 Tumores malignos y microambiente tumoral.....	2
1.3 Angiogénesis tumoral.....	4
1.4 Metástasis y transición epitelial a mesenquimal (EMT).....	7
1.5 Las células dendríticas como población celular presente en el microambiente.....	10
Capítulo 2	
2.1 Generalidades.....	13
2.2 Canales de potasio.....	15
2.2 El canal de potasio Eag 1.....	17
2.3 Estructura de EAG1.....	17
2.4 Moduladores de EAG1.....	18
2.5 EAG1 y Cáncer.....	19
Capítulo 3	
3. Antecedentes directos.....	21
3.1 EAG1 y proliferación celular.....	21
3.2 EAG1 y angiogénesis.....	22
3.3 EAG1 y células dendríticas.....	24
3.4 EAG1 y malignidad tumoral.....	25
3.5 Posible regulación de la expresión de EAG1 por el factor de transcripción MYT1L.....	25
Capítulo 4	
4. Justificación.....	27
Capítulo 5	
5. Objetivos.....	28
5.1 Objetivo general.....	28
5.2 Objetivos específicos.....	28
Capítulo 6	
6. Métodos.....	29
6.1 Cultivos celulares.....	29
6.1.1 líneas celulares y medios de cultivo.....	29
6.1.2 Cultivo de células dendríticas.....	30

6.2 RT-PCR.....	30
6.2.1 PCR de punto final.....	31
6.2.2 Southern blot.....	33
6.2.3 PCR en tiempo real.....	34
6.3 Citometría de Flujo.....	35
6.3.1 Anticuerpos utilizados.....	35
6.3.2 Procedimiento.....	36
6.4 Inmunocitoquímica.....	36
6.4.1 Tinción con peroxidasa.....	36
6.5 Electrofisiología.....	37
6.6 Ensayo de migración celular (Scratch assay).....	37
Capítulo 7	
7. Resultados.....	39
7.1 Regulación de la expresión de eag1 por VEGF en células HUVEC.....	39
7.2 Expresión de EAG1 en células dendríticas.....	40
7.2.2 EAG1 se encuentra en el núcleo de las células dendríticas.....	43
7.3 Expresión de eag1 en líneas celulares de cáncer de pulmón y durante el proceso de transición epitelial a mesenquimal (EMT).....	45
7.3.1 Expresión del mRNA de Heag1 en líneas celulares de cáncer de pulmón.....	45
7.3.2 Expresión de EAG1 durante un proceso de transición epitelial a mesenquimal (EMT).....	47
7.4 Regulación de la expresión de eag1 por el factor de transcripción MYT1L (Myelin Transcription factor Like-1).....	51
7.5 Resumen de resultados.....	53
Capítulo 8	
8 Discusión.....	54
8.1 Regulación de Heag1 por VEGF.....	54
8.2 Expresión de EAG1 en células dendríticas.....	55
8.3 Expresión de eag1 en líneas tumorales de pulmón y durante EMT.....	56
8.4 Regulación de la expresión de eag1 por el factor de transcripción MYT1L.....	60
Capítulo 9	
9 Conclusión.....	61
9.1 Conclusiones.....	61
9.2 Conclusión general.....	62
10. Perspectivas.....	63

RESUMEN

El canal de potasio activado por voltaje Ether à go-go (EAG1) se encuentra presente en más del 70% de tumores sólidos y algunos tipos de leucemias. Por el contrario, en tejidos sanos sólo se encuentran altos niveles del mRNA de EAG1 en el cerebro. Además, se ha descrito una expresión transitoria del canal en mioblastos, momentos antes de su fusión, y una pequeña cantidad de transcritos en placenta y en testículos. Los primeros estudios de la expresión y actividad del canal en células tumorales mostraron que éste estaba fuertemente involucrado en la proliferación celular; sin embargo, estudios recientes han mostrado que EAG1 podría estar participando en diferentes procesos que ocurren en el microambiente tumoral. Es mas, éste podría estar expresado en varios tipos celulares que residen en el interior de un tumor. Por ejemplo, hemos mostrado con anterioridad que el mRNA de EAG1 se puede encontrar en células endoteliales humanas provenientes del cordón umbilical (HUVEC), y que tal expresión es modulada por estradiol y reprimida por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Debido a este inesperado e interesante resultado, en este trabajo realizamos los experimentos que confirmaron estos datos. Este resultado gana además relevancia debido a que se ha encontrado recientemente que algunas células que expresan EAG1 muestran una mayor secreción de VEGF que aquellas que carecen del canal. Otros estudios han señalado el posible rol de EAG1 en la adquisición de un fenotipo maligno. Por ejemplo, la metástasis de células tumorales de pulmón se ve afectada por la inhibición de la expresión de EAG1, y una alta expresión del canal ha sido encontrada en células invasivas de cáncer de mama. En acuerdo con estas observaciones, en este trabajo hemos observado que las células tumorales de pulmón, A549, tienen una mayor expresión de EAG1 a medida que se encuentran en un proceso de transición epitelial a mesenquimal, lo cual sugiere que la expresión del canal podría ser promovida a medida que las células de un adenocarcinoma de pulmón adquieren un fenotipo más maligno.

En adición en este trabajo, nosotros evaluamos la expresión de EAG1 en las células dendríticas (que también están presentes en el microambiente tumoral) y observamos que el canal se encuentra en el área perinuclear, lo cual coincide con resultados reportados

recientemente. Finalmente también se intentó encontrar un factor de transcripción que regulara la expresión de EAG1. Nosotros propusimos el *myelin transcription factor 1-like* (MYT1-L) como posible regulador debido a su expresión en cerebro y en algunos tumores del sistema nervioso donde también se encuentra EAG1; sin embargo nuestros resultados no respaldan nuestra hipótesis puesto que MYT1-L no fue encontrado en células tumorales que presentan una alta expresión de EAG1 como lo son las células MCF-7, CaCu y A549.

ABSTRACT:

The voltage-gated potassium channel Ether à go-go (EAG1) has been found in up to 70% of solid tumor cells and some types of leukemia. On the contrary, in healthy tissues, higher levels of mRNA from EAG1 are only found in the brain. It has also been detected a transient expression in myoblast, before fusion, and a small quantity of mRNA in placenta and testis. Early observations regarding expression and activity of EAG1 in cancer cells showed that it was strongly involved in cell proliferation; however studies recently conducted have shown that that EAG1 might be participating in different processes that occurs in the tumor microenvironment. In addition it might also be expressed in several tumor cells that reside inside a tumor. For instance, we have previously observed that mRNA from EAG1 is found in human endothelial cells from the umbilical cord (HUVEC) and such expression is modulated by estradiol and it is down-regulated by the vascular endothelial growth factor (VEGF). Because it was an unexpected and interesting result in this work we performed the experiments that confirmed this data. It also has gained relevance since it was recently found that different types of cells bearing EAG1 show a higher secretion of VEGF in comparison with those lacking the channel. Other studies have also stressed the probable role of EAG1 in the acquirement of a malignant phenotype. Metastasis of lung cancer cells has been impaired by the inhibition of expression of EAG1 and higher expression of the channel has been found in invasive breast cancer cells. In agreement with those observations, in this work we have found that the lung cancer cells, A549, have an increased level of mRNA from EAG1 as they undergoing an epithelial-to-mesenchymal process, which suggests that expression of EAG1 could be enhanced in lung adenocarcinoma cells as they acquire a more malignant phenotype.

In addition, in this work we assessed the expression of EAG1 in dendritic cells (that can also be found in the tumor microenvironment), and we observed that the channel is located in the perinuclear area, which agrees with data reported recently. Finally we also tried to find a transcription factor regulating the expresion of EAG1. We proposed myelin transcription factor 1-like (MYT1-L) as a probable regulator of the channel expression due to its restricted expression in brain and in some tumors of the nervous system where the

expression of EAG1 has also been detected. However our results do not support such hypothesis because MYT1-L was not expressed in tumor cells that show a high level of EAG1 such as MCF-7, CaCU and A549.

1

El cáncer

1.1 Generalidades

El cáncer parece ser una enfermedad tan antigua como lo es la vida de los organismos unicelulares en el planeta. Testimonio de esto son los tumores encontrados en huesos de dinosaurios y en momias humanas en Egipto y Perú. Su estudio y tratamiento ha quedado asentado en documentos que datan de 2000 a 1500 años antes de Cristo como el *Ramayana* de la india o el papiro Ebers. Es bien conocido que el nombre de cáncer proviene de la forma adquirida por los tumores de mama, la cual recordaba un cangrejo de acuerdo a la descripción que hace Galeno en su tratado *Definitiones medicae* (Cortinas, 1997).

Bajo la denominación de cáncer se engloban un conjunto de enfermedades que varían en sus manifestaciones clínicas y en su respuesta a las medidas terapéuticas, pero que comparten mecanismos desencadenantes comunes (Cortinas, 1997). En general los tipos de cáncer se generan por un crecimiento anormal de las células debido a múltiples cambios en la expresión génica que conducen a una ruptura del balance entre proliferación y apoptosis que, en última instancia, genera una población de células que tienen la capacidad de invadir y colonizar (metastatizar) órganos distantes, causando una morbilidad significativa e incluso la muerte (Ruddon, 2007).

Cerca del 90% de los tumores se generan en los epitelios, que son las capas que recubren la superficie de muchos órganos del cuerpo humano. Éstos se denominan carcinomas, y es posible que su preponderancia se deba a que este tipo de tejido presenta una alta tasa de proliferación y suele ser el más expuesto a varios tipos de daños físicos y químicos. Otro conjunto de tumores es el que está compuesto por las leucemias y los linfomas. Estos se producen en las células precursoras de células sanguíneas y en los tejidos linfáticos. A diferencia de los carcinomas, afectan con frecuencia a la población infantil y juvenil, causando un alto impacto moral, económico y social, pues reducen su esperanza de vida y

productividad. Un último tipo de tumores está compuesto por los sarcomas. Éstos se originan en el tejido conectivo y en las estructuras de soporte, músculo, nervios, así como en los vasos sanguíneos y linfáticos.

El cáncer es responsable de aproximadamente el 13% de las muertes a nivel mundial (World Health Organization 2008). En México es considerado la tercera causa de muerte entre las mujeres con 35,303 defunciones (15.4%), mientras que en los hombres es la cuarta con 33,509 muertes (11.8%) (www.inegi.org.mx, Octubre 2010). El tipo de cáncer que más víctimas cobró en la población femenina en el año 2008 fue el cáncer de mama, seguido por los cánceres de cuello uterino, hígado, estómago, tráquea, bronquios y pulmón, y páncreas. Por otro lado, el mayor número de defunciones en la población masculina debido al cáncer ocurre entre aquellos que padecen cáncer de próstata, seguido por quienes presentan cáncer de pulmón, bronquios y tráquea, estómago e hígado (sinais.salud.gob.mx/descargas/xls/m_012.xls, Junio de 2011). Estas estadísticas muestran al cáncer como un problema de salud pública en la nación; es por ello que se requieren investigaciones que conduzcan al desarrollo de métodos de diagnóstico y tratamiento que permitan una detección temprana de la enfermedad y la reducción de la mortalidad como consecuencia de su padecimiento.

1.2 Tumores malignos y microambiente tumoral

Los tumores cancerosos constituyen agrupaciones o clones de células, derivados de una sola célula, que adquieren y transmiten un comportamiento que las lleva a proliferar de manera distinta a las células de su misma estirpe, e incluso a abandonar el lugar en el que se originaron para invadir otros lugares del cuerpo de un individuo afectado por cáncer (Cortinas, 1997).

En el interior de un tumor, junto con las células transformadas, conviven otros tipos celulares como fibroblastos (conocidos como fibroblastos asociados a tumores), células endoteliales, epiteliales sanas, componentes del sistema inmune y células del sistema linfático (figura 1). Todos estos grupos celulares interactúan a través de la liberación de un

conjunto de factores solubles entre los que destacan factores de crecimiento y las quimocinas (Parker & Siemann, 2011). La comunicación entre las células transformadas y las células que componen su medio ambiente permite el desarrollo de procesos que son claves para la progresión del tumor hacia estadios más malignos. A menudo tal interacción celular conduce a la activación del estroma, la inducción de angiogénesis, la proliferación de fibroblastos y el reclutamiento de mediadores de inflamación (Ronnov-Jessen et al. 1996, Tlsty & Hein, 2001). Al mismo tiempo, esta interacción con células del estroma estimula en las células cancerosas la secreción de un conjunto de proteínas que se encargan de la degradación de la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés *Extracellular Matrix*), e impactan su movilidad, su capacidad de invasión y su capacidad de adherencia (Parker & Siemann, 2011). Se ha propuesto que, al menos en un conjunto de tumores, la transición de las células epiteliales cancerosas hacia un fenotipo mesenquimatoide, de mayor movilidad, conlleva una activa liberación de proteínas degradadoras de matriz con la consecuente remodelación de la ECM. En los capítulos siguientes se va a describir con más detalle los procesos de angiogénesis y metástasis aquí mencionados. También se describirán las células del sistema inmune que normalmente se encuentran en un tumor, haciendo énfasis en un tipo de célula conocido como dendrítica, debido a la importancia que estas tienen en la realización de este trabajo.

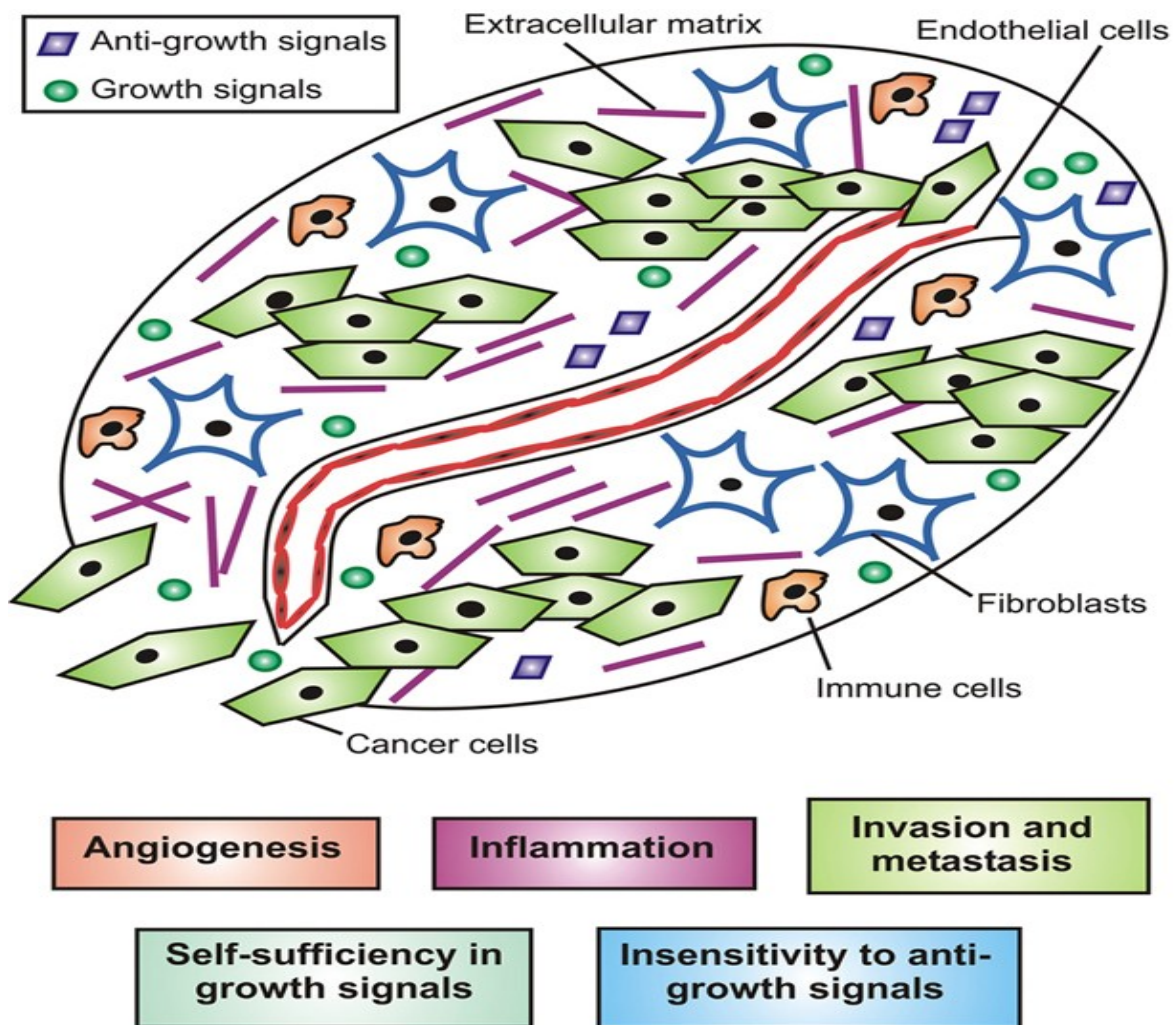


Figura 1. Microambiente tumoral. Células de diferentes estirpes como células del endotelio vascular, epiteliales transformadas y en diferentes estados, fibroblastos y células del sistema inmune, conviven en el interior del tumor, interactuando y generando procesos como la angiogénesis y la migración de las células epiteliales transformadas, favoreciendo así la progresión tumoral. Tomado de Nyberg et al. 2008.

1.3 Angiogénesis tumoral

Se da el nombre de angiogénesis a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de un lecho vascular pre-existente. El proceso se desarrolla de la siguiente manera: las células del endotelio vascular estimuladas por factores de crecimiento secretan proteasas y activadores

del plasminógeno que degradan la membrana basal, permitiendo la invasión de la matriz extracelular circundante. La acción de proteasas sobre la matriz extracelular expone puntos críticos que guían a las células endoteliales hacia su diana, y además permite la liberación de factores de crecimiento, anclados en ella, que retroalimentan positivamente el proceso. Una vez en el lugar demandante de vasos sanguíneos, las células endoteliales proliferan y se diferencian para formar el lumen del vaso naciente. Finalmente, las células del nuevo endotelio depositan una nueva membrana basal, y secretan sustancias que reclutan células de soporte como pericitos y células de músculo liso, asegurando la estabilidad del vaso sanguíneo. Se ha observado que el reclutamiento insuficiente de las células de soporte tiene como resultado una proliferación descontrolada de las células endoteliales, una excesiva permeabilidad vascular, fragilidad en el vaso e hipoxia (Cross & Claesson- Welsh, 2001; Carmeliet, 2003).

La angiogénesis es un proceso que ocurre principalmente durante el desarrollo fetal. En el individuo adulto ésta está disminuida, presentándose durante la restitución tisular, el ciclo menstrual, el desarrollo de la glándula mamaria en la pubertad y el embarazo, y durante la placentación (Augustin, 2005). Puesto que la angiogénesis en el adulto sano está prácticamente restringida al tracto reproductivo de la mujer, su manifestación en condiciones diferentes a las descritas se asocia con el desarrollo de una patología. Así, la angiogénesis se ha vinculado estrechamente con patologías tales como: cáncer, aterosclerosis, psoriasis, dermatitis alérgica, sarcoma de Kaposi en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), retinopatía diabética, hipertensión pulmonar primaria, endometriosis, artritis, osteomielitis e incluso obesidad (Carmeliet, 2003).

Aunque los tumores tienen la capacidad de reclutar y desarrollar una nueva y funcional red vascular, los vasos sanguíneos formados presentan un número de prominentes anomalías que impactan el crecimiento tumoral, la progresión y la respuesta a varias terapias antitumorales. Por ejemplo, entre las anomalías estructurales y morfológicas se encuentran la excesiva dilatación de los vasos sanguíneos, la presencia de sectores que contienen anomalías o ausencia de la membrana basal, poca presencia de pericitos y alta permeabilidad. Como resultado de estas características, el flujo sanguíneo y la

perfusión dentro de los tumores pueden ser bastante heterogénea e irregular, conduciendo a la aparición de áreas de elevada hipoxia y con baja presencia de nutrientes. Esto explica las diferencias de crecimiento que ocurren en un mismo tumor. La marcada permeabilidad de la vasculatura tumoral puede llevar una alta extravasación de moléculas de elevado peso y fluido hacia el ambiente extracelular; con el tiempo la elevada presión intersticial puede limitar o retardar la difusión de ciertos medicamentos (Jain, 2005; Yang et al. 2005).

Dentro de los factores que promueven la angiogénesis destaca la isoforma 165 (165 aminoácidos) de la familia de factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF), más conocida como factor de crecimiento endotelial vascular tipo A (VEGF-A₁₆₅). VEGF-A₁₆₅ es una glicoproteína dimérica esencial para muchos procesos angiogénicos en estados normales y patológicos, y exhibe dos principales actividades biológicas: la capacidad para promover la migración, supervivencia y proliferación de las células endoteliales, y la capacidad de aumentar la permeabilidad del endotelio vascular. Su efecto biológico relevante para la angiogénesis (migración, proliferación y supervivencia) lo efectúa mediante la unión a un receptor con actividad de tirosina cinasa denominado VEGFR-2 (conocido también como Flk-1 [*fetal liver kinase*, en inglés] o KDR [*kinase insert domain*, en inglés]). Una vez unido a su receptor, VEGF-A₁₆₅ induce la activación de las enzimas fosfolipasa C γ (PLC γ), y fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K), promoviendo con ello la proliferación y supervivencia celular respectivamente. En adición a lo anterior, la unión VEGF-VEGFR-2 estimula la síntesis y secreción de enzimas que degradan la matriz extracelular favoreciendo así la migración de las células endoteliales (Cross & Claesson-Welsh; Zachary, 2005).

A comienzos de la década de los 70's el trabajo pionero de Judah Folkman sentó las bases sobre las cuales se inició la era de la terapia angiogénica. La hipótesis establece que los tumores no crecen más de 2 mm³ a menos que cuenten con una adecuada red vascular que provea el oxígeno y los nutrientes necesarios para el crecimiento. Por encima de este umbral los tumores avasculares obtienen mediante difusión pasiva los elementos necesarios para sobrevivir y mantener un estado de latencia en el cual la tasa de crecimiento y muerte

está en equilibrio. Esta condición se desplaza hacia la proliferación una vez que los factores pro-angiogénicos son secretados en el microambiente tumoral; así la administración de moléculas que eviten la acción de tales factores pro-angiogénicos podrían suprimir la angiogénesis tumoral y mantener al tumor en un estado de latencia o incluso de regresión si se logra la regresión de los vasos formados. El objetivo de esta terapia es convertir el cáncer en una enfermedad crónica y manejable con un tratamiento a largo-plazo, el cual se facilita por la ausencia de angiogénesis en los adultos sanos (Folkman 1971, Folkman 2007).

1.4 Metástasis y transición epitelial a mesenquimal (EMT)

La metástasis es el proceso por el cual las células transformadas escapan de su lugar de origen para diseminarse a otros sitios del organismo haciendo difícil la erradicación de la enfermedad. El proceso ocurre en una serie de pasos que involucran la pérdida de las uniones que mantienen unidas a las células de un tejido, la adquisición de la capacidad de moverse a través de las paredes de los vasos sanguíneos así como la capacidad para invadir y sobrevivir en un tejido diferente al de origen (Cortinas 1997).

En lo que respecta a la pérdida de adhesión celular, se ha propuesto que uno de los procesos que facilita su ocurrencia es el denominado “transición epitelial a mesenquimal” (EMT, por sus siglas en inglés). La EMT es un proceso fundamental durante el desarrollo del embrión, pues hace posible la formación de mesenquima primario, las válvulas del corazón, el músculo esquelético, el paladar, y da origen a las células migratorias de la cresta neural (Mercado-Pimentel et al. 2007). Por otro lado, características de la EMT han sido observadas en modelos de cáncer de mama (Trimboli et al. 2008), ovario (Vergara et al. 2010), colorrectal (Brabletz et al. 2005) y esofágico (Usari et al. 2005); así como en líneas celulares de cáncer de pulmón y de colon (Micalizzi et al. 2010). La EMT oncogénica está asociada a la pérdida de la polaridad apical-basal (Ozdamar et al. 2005), la desintegración de las uniones estrechas (Ikenouchi et al. 2003), cambios en el citoesqueleto, disminución en la expresión de citoqueratinas y la sobre-expresión del marcador mesenquimal conocido como vimentina (Kokkios et al. 2007), así como con un incremento en la adquisición de un

fenotipo móvil e invasivo emulando lo que acontece en la EMT vinculada al desarrollo (figura 2). Muchas de las moléculas reguladoras del proceso durante el desarrollo también se expresan y participan durante la EMT oncogénica; éste es el caso de los factores de transcripción Twist, Snail/Slug, Lbx1 y Six1, y las vías de señalización del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF β 1) y de la formada por las proteínas Wnt y β -cateninas. Es por estas razones que se ha propuesto que la ocurrencia de EMT en las células cancerosas refleja la activación de programas genéticos embrionarios durante la tumorigénesis y posterior progresión tumoral (Micalizzi et al. 2010).

Un fenómeno clave que ocurre durante la EMT y que conduce a la pérdida de adherencia celular es la disminución en la expresión de la molécula E-caderina, la cual es el miembro prototipo de un conjunto de proteínas que forman uniones célula-célula. Durante la EMT su represión transcripcional está dirigida por la acción de Snail/Slug y Twist. Con esto se favorece el desprendimiento de la célula transformada de la lámina epitelial. Como evidencia de la importancia que este fenómeno tiene en el desarrollo de la metástasis, se ha observado en modelos animales que la inhibición de la expresión de E-caderina promueve la invasión tumoral y la aparición de un elevado número de metástasis (Perl et al. 1998).

Por todo lo anterior se ha sugerido que en el contexto de tumores epiteliales, la EMT promueve una vía por la cual las células transformadas adquieren la habilidad de abandonar el tumor primario e invadir el tejido local y los vasos sanguíneos, estableciendo así las condiciones para el desarrollo de la metástasis. Aunque su ocurrencia en los tumores es aun polémica, hay evidencias que muestran cómo los tumores que expresan las moléculas relacionadas con el proceso de transición epitelial a mesenquimal correlacionan con pobres pronósticos y mayor agresividad tumoral (Prasad et al. 2009, Logullo et al. 2010).

En muchos casos lo anteriormente expuesto involucra la pérdida de la molécula E-caderina, la cual es una glicoproteína transmembranal con dominios extracelulares que participan en la formación de las uniones célula a célula y con dominios citoplasmáticos que permiten su interacción con el citoesqueleto de actina a través de las cateninas. Los tumores bien diferenciados tienden a mantener la expresión de E-caderina, mientras que en aquellos pobremente diferenciados ocurre lo contrario. En respuesta a algunos factores de

crecimiento, cinasas de la familia de Src se encuentran involucradas en la disminución de la expresión de E-caderina. Algunas vías de señalización como las de Wnt, TGF- β , factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), o factor nuclear (NF)- κ B, suprimen la expresión de E-caderina por medio de la activación de represores transcripcionales específicos como son SNAIL, SLUG y TWIST. Es interesante notar que tanto los represores de la expresión de E-caderina como las vías de señalización que llevan a su activación están involucradas en el proceso por el cual células epiteliales pierden muchas de sus características adquiriendo un fenotipo mesenquimatoide caracterizado también por su alta movilidad. A este proceso se le conoce como transición epitelial a mesenquimal, y se ha propuesta como una de las vías por las cuales las células tumorales evolucionan a estados de mayor malignidad (Minn & Massagué, 2009).

Desarrollo embrionario

Cáncer

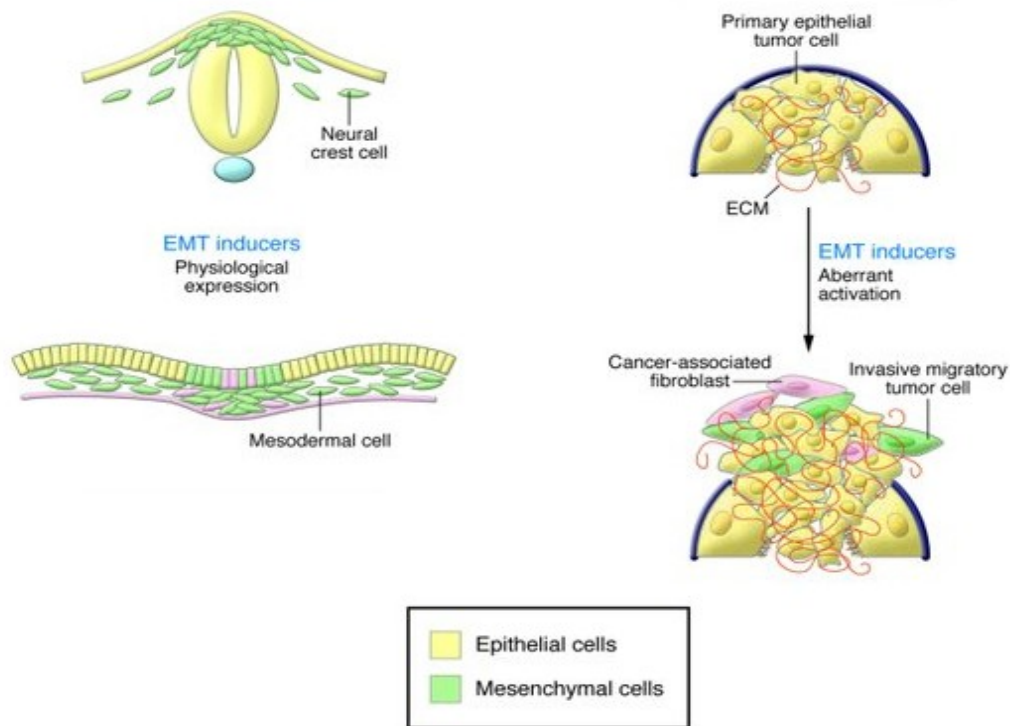


Figura 2. EMT durante el desarrollo embrionario y EMT oncogénica. Mediante la EMT se forman las células que dan origen al mesénquima primario y células de la cresta neural. En el cáncer esta transformación da origen a células con mayor capacidad de migrar a tejidos circundantes. Modificado de Acloque et al. 2009.

1.5 Las células dendríticas como población celular presente en el microambiente tumoral

Como se mencionó con anterioridad, un tumor no sólo está compuesto de células transformadas, fibroblastos, células de tipo mesenquimatoide y células de la vasculatura sanguínea y linfática, sino que también se encuentran células del sistema inmune innato y adaptativo; en especial, el desarrollo tumoral se ve promovido cuando las células cancerosas aprovechan la relación con estas últimas. Por ejemplo las células del sistema

inmune innato secretan un conjunto de citocinas, quimocinas, metaloproteinasas, proteinasas, especies reactivas de oxígeno, entre otras, que regulan procesos como la angiogénesis, la proliferación celular, la sobrevivencia y la remodelación de la matriz extracelular. Como complemento de lo anterior, las células del sistema inmune adaptativo contribuyen a la evasión tumoral de respuestas inmunes antitumorales (Visser et al. 2006).

Un tipo de célula del sistema inmune que se encuentra presenta en el microambiente tumoral es la célula dendrítica (DC). Este tipo de células son presentadoras de antígeno profesionales capaces de inducir una respuesta inmune primaria y de consolidar así una memoria inmunológica. En humanos se pueden originar *in vitro* a partir de células mononucleares periféricas CD14⁺ o de células de médula ósea CD34⁺. En su ciclo de vida, permanecen como DC inmaduras residentes de los diferentes tejidos del organismo. En este estado pueden secretar diversas citocinas y quimiocinas ante la presencia de un patógeno, promoviendo el reclutamiento y la activación de neutrófilos, monocitos, macrófagos y células *natural killer* (NK). En este estado también tienen la capacidad de capturar antígenos. Una vez hecho esto, las DC adquieren la capacidad de migrar hacia los ganglios linfáticos, donde después de alcanzar un estado maduro, presentan el antígeno a linfocitos T cooperadores CD4⁺, citotóxicos CD8⁺ y células B, induciendo en ellos procesos de expansión y diferenciación e iniciando la respuesta inmune. (Figura 3) (Bancherau et al. 2000, Tiwari, 2010).

Poblaciones de células dendríticas han sido identificadas en carcinoma bronco-alveolar, cervical, de endometrio y esofágico. En cáncer de mama se han encontrado DC inmaduras CD1a⁺, identificadas como langerina (tipo célula de Langerhan), principalmente en el interior tumoral y células maduras CD83⁺ confinadas a áreas periféricas. También se han identificado DC en pacientes con cáncer gástrico, colorrectal y de vesícula; en estos últimos una marcada infiltración de DC se ha asociado con un mejor pronóstico. Se ha sugerido que, además de capturar antígenos tumorales y de iniciar así una respuesta antitumoral, las DC promueven la sobrevivencia del linfocito mediante la co-estimulación y la liberación de citocinas (Lutze et al. 1993). Se ha propuesto también que mediante la liberación de interleucinas (IL) como la IL-6 e IL-10 y/o citocinas como el VEGF las células tumorales

evitan la diferenciación de las DC y suprimen su capacidad como presentadoras de antígeno, evadiendo de esta manera la vigilancia antitumoral inmunológica (Visser et al. 2006).

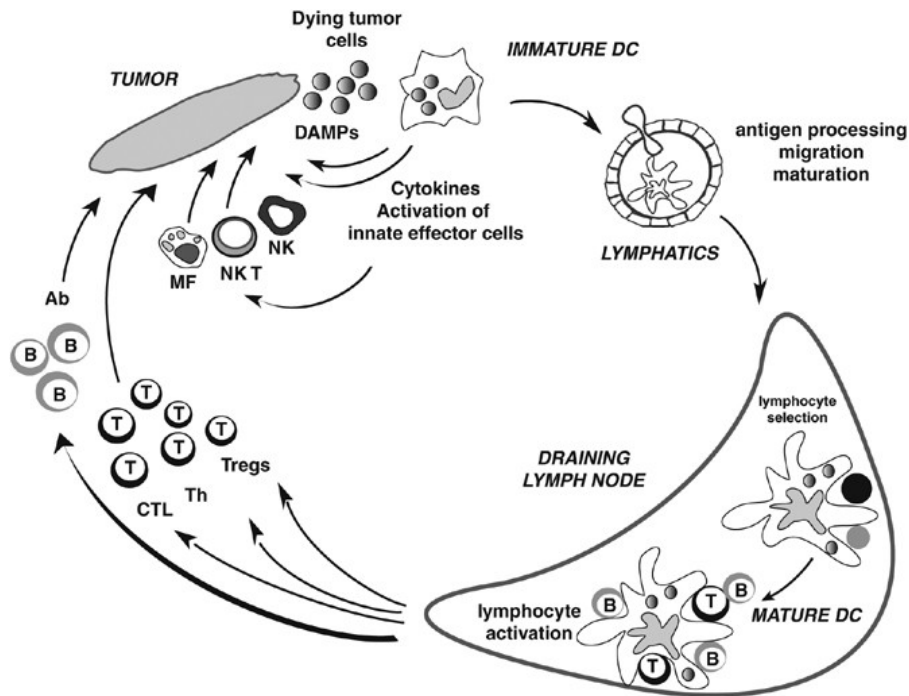


Figura 3. Ciclo de vida de las células dendríticas (DC). Las células dendríticas inmaduras son residentes habituales en diferentes tipos de tejidos. Una vez detectada una señal de peligro, la célula dendrítica secreta una serie de citocinas que activan otros componentes celulares del sistema inmune. Una vez que la maduración es inducida por la señal de peligro, las DC tienen la capacidad de migrar a los ganglios linfáticos donde activan a diferentes tipos de linfocitos. Tomado de Lutze et al. 1993.

2

Canales iónicos

2.1 Generalidades

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana que se encuentran en todas las células del organismo permitiendo el paso transmembranal de iones inorgánicos (sodio, potasio, calcio, etc.) de acuerdo con su gradiente electroquímico (Kandel et al. 2000). Los canales iónicos poseen tres propiedades importantes: 1) conducen iones, 2) responden a un conjunto diverso de señales, y 3) la mayoría son selectivos con respecto al tipo de ión que conducen.

La propiedad conductora de un canal se determina midiendo la corriente iónica que fluye a través del canal en función de la fuerza electroquímica impulsora (diferencia de potencial eléctrico y químico a través de la membrana). En algunos canales la magnitud de la corriente iónica varía de manera lineal con respecto a la fuerza electroquímica, comportándose como una resistencia simple; en otros la relación corriente iónica – fuerza electroquímica es no-lineal. A este último grupo de canales se les denomina rectificadores y se caracterizan por conducir los iones con mayor eficiencia en una dirección que en otra (Kandel et al. 2000).

Los canales iónicos responden a los estímulos cambiando su conformación. Éstos presentan dos o más tipos de configuraciones, que a su vez representan un estado funcional. El estado abierto es aquel en el cual el canal permite el flujo de corriente; por el contrario, en los estados cerrado e inactivo, no hay corriente iónica fluyendo a través del canal. Los estímulos que ocasionan los cambios conformacionales, y en consecuencia los distintos estados funcionales de los canales iónicos, son de naturaleza heterogénea, siendo los más comunes: cambios en el potencial eléctrico de la membrana (voltaje), cambios en la presión que se ejerce sobre la membrana o por estiramiento de la misma (mecánicos) y cambios producidos por la unión de una sustancia en la cara intracelular o extracelular del canal (químicos). De acuerdo con estos tres tipos de estímulos los canales iónicos se han

clasificado en: canales dependientes de voltaje, canales regulados por ligando y canales regulados mecánicamente; Además, también se ha reportado la existencia de canales regulados por temperatura y variaciones del pH (Kandel et al. 2000; Pollard & Earnshaw, 2000). La selectividad del canal está determinada por el tamaño del ión en solución y por la estabilidad de las interacciones entre éste y un conjunto de aminoácidos que se encuentran presentes en una región del canal denominada filtro de selectividad. A pesar de lo anteriormente expuesto, existen canales que permiten el paso indiscriminado de cationes inorgánicos, como algunos pertenecientes a la familia TRP (en inglés: *transient receptor potential*). Según el ión al cual son selectivos los canales iónicos se han clasificado en: canales de sodio, canales de potasio, canales de cloruro y canales de calcio (Kandel et al. 2000).

Los canales iónicos participan en múltiples procesos como la regulación de la excitación celular en el sistema nervioso y muscular, la secreción hormonal, la transducción sensitiva, la regulación de la presión sanguínea y la proliferación celular. Por tanto, defectos en la función de los canales iónicos pueden acarrear serios trastornos fisiológicos. Las enfermedades causadas por trastornos en la función de estas proteínas es lo que se conoce como canalopatías. Estas pueden surgir por defectos en la regulación intracelular del canal, por su acción letal sobre otras células, por acción de agentes que modifican su actividad, por mutaciones en la región codificante de sus genes conduciendo a una ganancia o pérdida de una función, o por mutaciones en la región promotora del mismo llevando a una expresión exacerbada o reducida del canal (Ashcroft, 2000). Un conjunto de canales de potasio ha llamado fuertemente la atención por su participación en la proliferación celular, y su expresión aberrante en diferentes tipos de cáncer. Esto último ha motivado a algunos autores a denominar como canalopatías estas patologías (Camacho, 2006). En la sección siguiente se describirá al grupo general de canales de potasio para posteriormente exponer algunos de los hallazgos que llevaron a considerarlos agentes activos durante la proliferación celular.

2.2 Canales de potasio

Los canales de potasio son un grupo bastante diverso en lo que respecta a su regulación y estructura. Están formados por cuatro subunidades, sintetizadas independientemente, dispuestas simétricamente alrededor de un poro central. Cada subunidad se compone de dos, cuatro o seis segmentos transmembranales (TM), uniéndose aquellas con un mismo número de segmentos para formar un canal de potasio funcional (Figura 4). Independientemente del número de TM todas las subunidades contienen una secuencia de cinco aminoácidos (treonina, valina, glicina, tirosina y glicina) bastante conservada que constituye el filtro de selectividad del canal. De acuerdo al número de TM de las subunidades que componen los canales de potasio, éstos se han clasificado en:

1. Canales con subunidades de cuatro segmentos transmembranales: son canales que siempre permanecen abiertos y se denominan canales de fuga.
2. Canales con subunidades formadas por dos segmentos transmembranales: se comportan como rectificadores entrantes (conducen mejor corrientes que ingresan a la célula que aquellas que salen) y se denominan Kir (en inglés *inward rectifier*).
3. Canales con subunidades de seis segmentos transmembranales: agrupa a aquellos canales que son regulados por ligandos intracelulares y/o el potencial eléctrico transmembrana; ejemplo de ellos son: los canales regulados por el calcio intracelular, los canales de potasio dependientes de voltaje y los canales regulados por nucleótidos cíclicos (Coetzee et al. 1999).

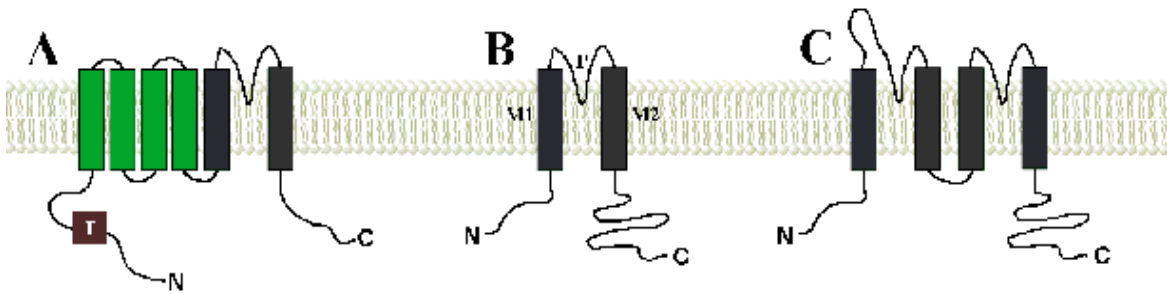


Figura 4. Subunidades de diferentes canales de potasio. A) Canal de potasio activado por voltaje; B) Canal de potasio rectificador entrante (Kir). M1 y M2: segmentos transmembrales. P: región poro; C) Canales de fuga. Tomado de www.edoc.hu-berlin.de

Como se escribió en la sección anterior, los canales de potasio están involucrados en el mantenimiento del potencial de reposo de la célula, en la repolarización del potencial de acción, y consecuentemente en la regulación de la excitabilidad de nervios y músculos, incluyendo el músculo cardíaco. También cumplen un importante rol en la modulación de la transmisión sináptica, la secreción de sustancias por parte de células endocrinas (tales como las células β del páncreas), la captura de sales a nivel renal y la homeostasis de electrolitos en la sangre y otros fluidos corporales. Por lo anteriormente expuesto, es fácil suponer que mutaciones que alteran la expresión o la función de los miembros implicados en los procesos fisiológicos descritos arriba conducen a la aparición de diversas canalopatías. En el ámbito médico han sido reconocidas como tales: la ataxia episódica, el síndrome QT largo, la epilepsia (estas a causa de mutaciones que afectan la funcionalidad de canales de potasio dependientes de voltaje favoreciendo la hiperexcitabilidad de la célula), el síndrome de Bartter, caracterizado por una alta concentración de sales en la orina, hipocalciuria e hipokalemia (producto de un conjunto de mutaciones que vuelven no funcional a uno de los rectificadores entrantes [Kir1.1] que se encuentran en el tubo distal) y la hipoglicemia hiperinsulinémica congénita persistente de la infancia (en inglés PHHI), consistente en una disminución de los niveles de glucosa debido a un exceso en la secreción de insulina (resultado de mutaciones que evitan la apertura del canal de potasio regulado por ATP que se encuentra presente en las células del páncreas (Ashcroft et al. 2000).

Un hecho que ha llamado poderosamente la atención durante los últimos 20 años es la participación de los canales de potasio en la proliferación celular. Por la importancia que tiene este tema en el desarrollo de este trabajo, en la siguiente sección se describirán los hechos que llevaron a proponer a los canales de potasio como elementos activos durante este proceso.

2.2 . El canal de potasio Eag 1

La familia de canales eag es una clase importante de canales permeables a potasio compuesta por tres subfamilias: EAG, ERG y ELK. El gen que codifica para el miembro fundador de la familia, *eag*, fue identificado por primera vez en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), debido a una mutación que determina un fenotipo caracterizado por la sacudida de sus patas cuando son anestesiadas con éter, hecho que evocó en los investigadores el baile à go-go de moda por los años sesenta. A principios de los años ochenta se propuso que *eag* podía codificar para un canal de potasio, pues se observó que las motoneuronas de los mutantes para el locus presentaban potenciales de acción de alta frecuencia y una exacerbada secreción de neurotransmisores. Fue en 1993 cuando estudios de expresión en oocitos demostraron que *eag* efectivamente codifica un canal de potasio dependiente de voltaje (Warmke & Ganetzky, 1994; Camacho, 2006). El genoma humano tiene dos miembros de la subfamilia *eag* denominados *eag1* y *eag2*; este último codifica también para canales de potasio dependientes de voltaje. El canal EAG1 ha despertado un gran interés por su participación en el proceso de proliferación celular y su potencial oncogénico, y es éste el que se describirá a continuación.

2.3 Estructura de EAG1

EAG1 presenta la estructura típica de los canales de potasio dependiente de voltaje. Está compuesto por cuatro subunidades cada una formada por 6 segmentos transmembranales donde destaca el segmento S4 que actúa como sensor de voltaje, y la región poro, la cual se encuentra entre los segmentos S5 y S6. La estructura del canal presenta aspectos interesantes en lo que respecta a su regulación e interacciones con otras proteínas celulares.

Una parte substancial de su extremo amino terminal tiene un dominio Per-Arnt-Sim (dominio PAS) que lo hace potencialmente sensible a cambios en el oxígeno intracelular. Su largo extremo carboxilo terminal contiene dominios de unión para nucleótidos cíclicos (Ochiodoro et al. 1998), calcio-calmodulina (Shonherr et al. 2000) y para la cinasa activada por calcio-calmodulina II (CamKII; Sun et al. 2004), así como dominios de localización nuclear y de tetramerización (figura 5). Su región poro contiene dos residuos extracelulares a los cuales se unen anillos azucarados que tienen un papel importante en el correcto procesamiento del canal y en la funcionalidad como tal de la proteína madura (Napp et al. 2005)

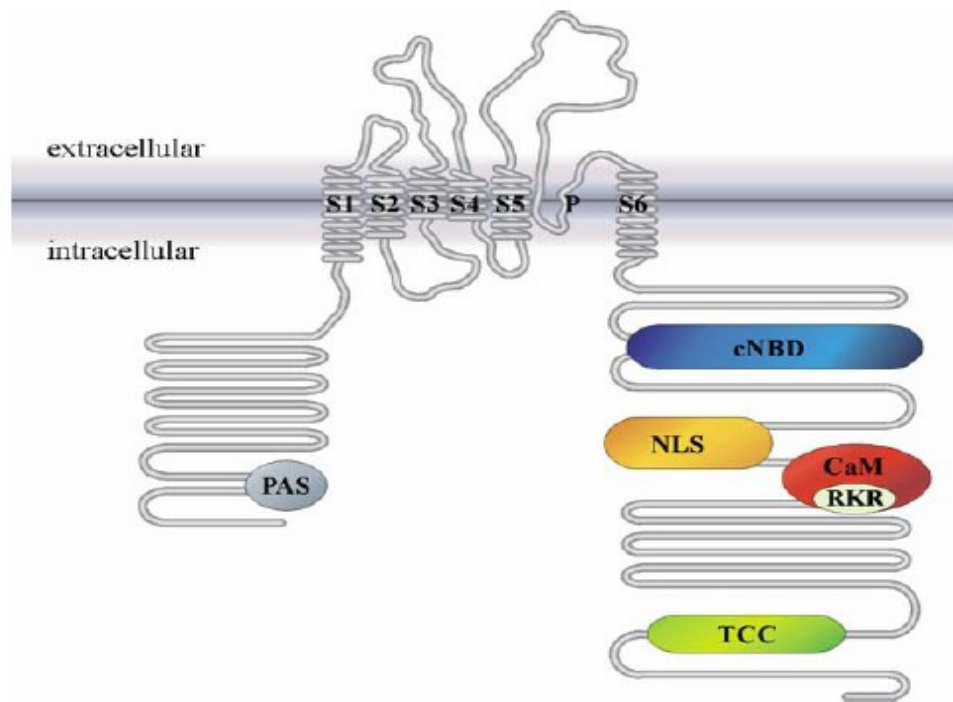


Figura 5. Estructura de EAG1 humano. PAS: dominio Per- Arnt-Sim, cNBD: dominio de unión de nucleótidos cíclicos, NLS: señal de localización nuclear, CaM: dominio para Calcio-Calmodulina, dominio de tetramerización. Tomado de Napp et al. 2005.

2.4 Moduladores de EAG1

La propiedad electrofisiológica más característica de EAG1 es su fuerte dependencia de un potencial previo a una despolarización fuerte. Las corrientes que fluyen por el canal se

activan lentamente y no se inactivan. Cuando son promovidas desde un potencial de mantenimiento menos negativo la cinética de activación es varias veces más rápida que cuando el potencial del prepulso se mantiene en valores más negativos (hiperpolarizantes). Este fenómeno está presente en todos los canales iónicos dependientes de voltaje y es llamado desplazamiento Cole-Moore. Sin embargo en EAG1 el desplazamiento Cole-Moore toma decenas de milisegundos mientras en otros canales de potasio dependientes de voltaje éste toma menos de un milisegundo. En adición a lo anterior, el desplazamiento Cole-Moore se acentúa en presencia de concentraciones fisiológicas de magnesio, el cual se une a regiones extracelulares de los segmentos S2 y S3 retardando la apertura del canal. (Ludwig et al. 1994; Terlau et al. 1996).

Las corrientes que fluyen por EAG1 son bloqueadas por el calcio intracelular mediante la activación de la proteína calcio-calmodulina. Ésta se une a dominios específicos en el carboxilo y amino terminal evitando la apertura del canal posiblemente de una manera estérica (Ziechner et al. 2006). Se ha observado que el EAG1 de *Drosophila* se une y es fosforilado por la cinasa dependiente de calmodulina, CamKII, en una manera independiente de calmodulina (Wang et al. 2002), por lo que se ha propuesto que éste puede ser un mecanismo de regulación del EAG1 en mamíferos. En adición se ha reportado que EAG1 interactúa con la proteína adaptadora Camguk/CASK, la cual también interacciona con CamKII (Marble et al. 2005). Finalmente, las corrientes de EAG1 se retardan en presencia de la proteína epsina en células HEK 293. Epsina ha sido implicada en la endocitosis de receptores a factores de crecimiento, y se encuentra en las terminales sinápticas donde también se encuentra EAG1 (Piros et al. 1999).

2.5 EAG1 y Cáncer

Después de varios reportes mostrando la relación de EAG1 con la proliferación celular, la mayor parte de investigación sobre el canal se dirigió a mostrar su participación en el cáncer. La expresión ectópica de EAG1 fue observada en muchas líneas celulares tumorales entre las que se encuentran SHSY-5Y (neuroblastoma), IGR1 e IPC298 (melanoma), EFM-19 y MCF-7 (mama) y HeLa (cérvix) (Meyer & Heinemann, 1998; Meyer et al. 1999;

Pardo et al. 1999). EAG1 ha sido detectado en más del 70% de tumores sólidos (Wulff et al. 2009) incluyendo los tumores de mayor mortalidad en México como el cáncer de mama (García-Barrera et al. 2010) y cervicouterino (Farias et al. 2004), y en leucemias (Downie et al. 2008). Por el contrario la expresión de EAG1 en los tejidos humanos sanos está prácticamente restringida al cerebro (donde es muy abundante) presentando menores niveles en testículo, glándula adrenal y placenta (Hemmerlein et al. 2006).

Cabe señalar que el otro miembro de la familia eag, EAG2, el cual comparte un 70% de homología con EAG1 (Ludwig et al. 2000), no muestra relación con la proliferación celular y el cáncer. Al igual que EAG1, EAG2 también presenta un marcado desplazamiento Cole-Moore, el cual es también acentuado en presencia de magnesio extracelular (Saganich et al. 1999). Su expresión está prácticamente restringida al sistema nervioso central y es candidato para la formación de proteínas heteroméricas con EAG1. La ausencia de un potencial oncogénico del canal EAG2 sugiere que la contribución de EAG1 al proceso oncogénico no depende exclusivamente de su rol como conductor de iones potasio, y podría depender en mayor medida de sus largos dominios intracelulares que son los que comparten menos homología con EAG2.

3

Antecedentes directos

3.1 EAG1 y proliferación celular

Un conjunto de observaciones sugieren la participación de EAG1 en la proliferación celular en condiciones patológicas. En células de neuroblastoma humano cuya diferenciación fue inducida mediante la aplicación de ácido retinoico, corrientes nativas similares a las reportadas para rEAG (EAG de rata) en oocitos, e identificadas como EAG1, fueron reducidas en un 95% con respecto al tratamiento en ausencia de la sustancia (Meyer & Heinemann, 1998). Brüggemann et al. (1997) reportaron la modulación dependiente del ciclo celular de las propiedades electrofisiológicas y de selectividad de EAG1 expresado heterológamente en oocitos de *Xenopus*. Cuando éstos son inducidos a entrar en mitosis mediante la aplicación del factor promotor de la mitosis MFP, se observa un incremento en la selectividad del canal y una reducción en la amplitud de las corrientes, así como un comportamiento rectificante dependiente de sodio. Esto ha llevado a proponer una posible interacción del canal con los microtúbulos, los cuales son reorganizados durante la fase M del ciclo celular (Camacho et al. 2000). La sobre-expresión de EAG1 produce un incremento de la proliferación de varias líneas celulares, medida por un aumento en la actividad metabólica, la incorporación de deoxibromouridina o el número de células. Pardo et al. (1999) reportaron que la transfección del rEAG en células de ovario de hamster chino (CHO) y en la línea celular derivada de fibroblastos NIH 3T3 produce la aparición de un fenotipo transformante, consistente en una elevada tasa de proliferación, una propensión a proliferar en un medio de cultivo con bajo porcentaje de suero y en ausencia de un sustrato sólido, y una pérdida de la inhibición del crecimiento por contacto. Una prueba contundente de la participación de EAG1 en el proceso de proliferación celular proviene de la inhibición de la expresión del canal; se ha observado que el uso de nucleótidos antisentido dirigidos de manera específica contra el transcrito del canal disminuye significativamente la proliferación de células CHO transfectadas con EAG1 (Pardo, 1999). Al igual que en

células CHO, el silenciamiento de EAG1 causa una significativa reducción en la proliferación de células derivadas de carcinoma colorectal, rhabdomyosarcoma, fibrosarcoma y cáncer de mama (Spitzner et al. 2007; Weber et al. 2006). Sumado a lo anterior, se ha observado que la reducción en las corrientes que fluyen por EAG1 está asociada a la disminución en la síntesis de DNA en las células derivadas de cáncer de piel IGR1 (Gavrilova-Ruch et al. 2002).

3.2 EAG1 y angiogénesis

Resultados recientes sugieren que EAG1 puede estar involucrado en la angiogénesis tumoral. Células HEK 293, CHO y NH3T3 transfectadas con EAG1 secretan entre dos y tres veces más cantidad del factor del VEGF que aquellas no transfectadas. En consonancia con lo anterior, los tumores formados por las células CHO y NH3T3 transfectadas con EAG1 presentan un mayor número de vasos sanguíneos en comparación con aquellos formados por células carentes del canal (Downie et al. 2008). La participación de EAG1 en la angiogénesis también podría no estar restringida a la célula tumoral. Macías (tesis de maestría 2005) observó la presencia transitoria del mRNA del canal en lisados de cordón umbilical de rata en momentos donde la placenta presenta una alta vascularización. En adición, nuestro grupo reportó que el canal está presente en el endotelio vascular de los vasos que irrigan la placenta (Díaz et al. 2009). Un resultado preliminar obtenido por Restrepo (2006) mostró que células HUVEC incubadas en ausencia de suero pero en presencia de VEGF (5ng/mL) por 24 horas, presentaban menores niveles de EAG1 que aquellas cultivadas en ausencia de suero y de la citocina (figura 6). También se obtuvo un resultado similar en un solo experimento donde se mantuvieron las células en ausencia de suero y en presencia de VEGF por 48 h (figura 7). Lo anterior, además de sugerir la participación de EAG1 en la angiogénesis tumoral, apunta a una posible regulación de su expresión por los factores que regulan este proceso.

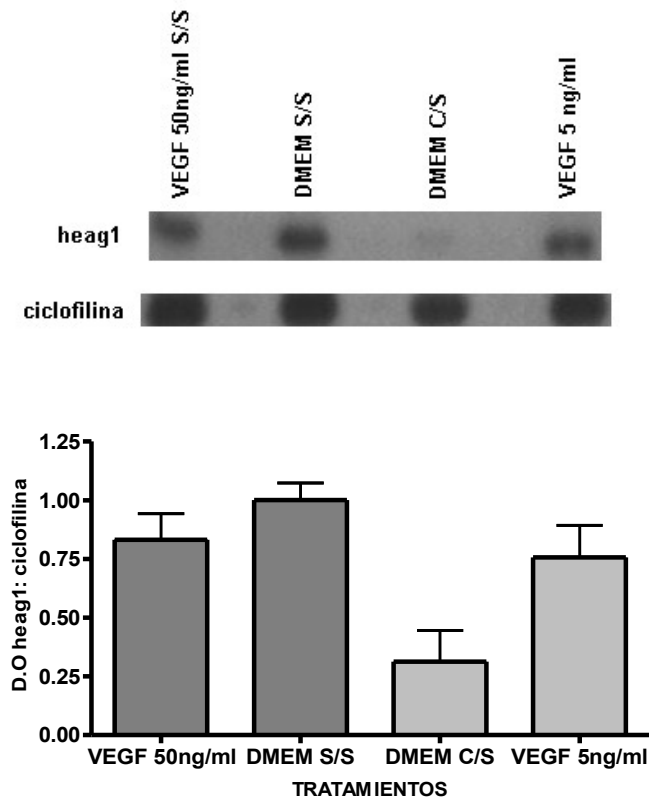


Figura 6. Regulación de la expresión del mRNA de EAG1 por VEGF añadido durante 24 h en células HUVEC. *Arriba:* Southern blot. La banda más intensa corresponde a la condición de DMEM sin suero fetal bovino (SFB). *Abajo:* Densidades ópticas promedio de tres experimentos independientes mostrando como VEGF modula la expresión de EAG1 en células HUVEC. Se observa como VEGF 50 ng/ml disminuye ligeramente el efecto de la ausencia de SFB en el medio de cultivo. La atenuación se marca un poco cuando la concentración de VEGF es 5 ng/ml. C/S: con suero; S/S: sin suero.

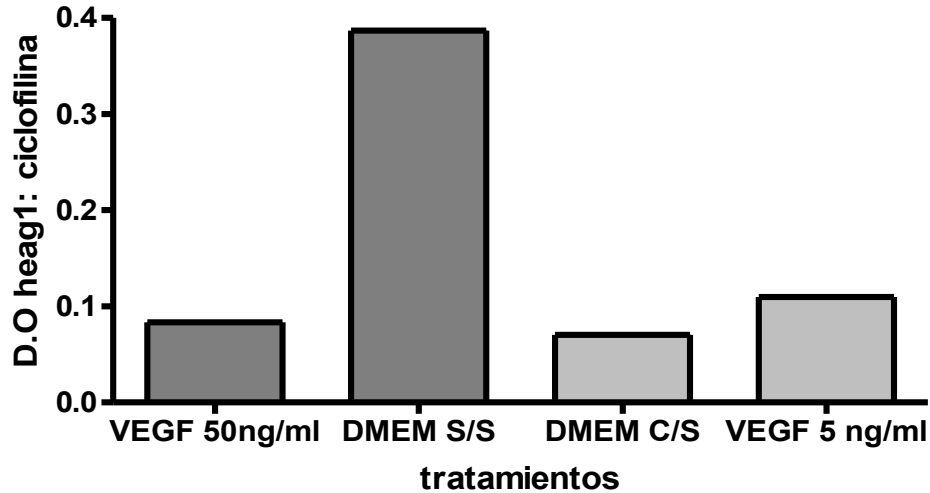


Figura 7. Efecto de VEGF (48horas) en la expresión del mensajero de EAG1 en células HUVEC cultivadas en DMEM libre de rojo fenol sin suplementar con SFB. C/S: con suero; S/S: sin suero.

3.3 EAG1 y células dendríticas

Las DC representan un subconjunto de células del sistema inmune encargadas de la captura, procesamiento y presentación de antígenos incidiendo así, de manera directa, en la activación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Se sabe que algunos canales iónicos como el canal de calcio no dependiente de voltaje TRPV1 (Tóth et al. 2009) y los canales de potasio Kv 1.5, Kv 1.3, así como un rectificador entrante de identidad desconocida (Mullen et al. 2006) se expresan en distintos estados de las DC y participan en los procesos de diferenciación (TRPV1) y en la adquisición de un fenotipo presentador de antígeno o de maduración (Kv1.5 y 1.3). Recientemente, una base de datos pública de microarreglos mostró que EAG1 se encuentra presente en DC humanas diferenciadas a partir de células mononucleares de la sangre (*Gene Expression Profiles (GEO)* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>, Octubre 2010). Sin embargo este resultado no ha sido confirmado por otras técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Una parte de este proyecto tiene como objetivo la evaluación de la expresión de EAG1 en

células dendríticas humanas obtenidas de monocitos circulantes en sangre periférica provenientes de personas catalogadas clínicamente como donantes sanos.

3.4 EAG1 y malignidad tumoral

EAG1 también podría tener una participación activa durante la progresión de las células tumorales hacia un fenotipo maligno. EAG1 presenta una mayor expresión en sarcomas agresivos con respecto a aquellos de menor agresividad (Mello de Queiroz et al. 2006). En adición, células invasivas de cáncer de mama muestran una mayor expresión del canal con respecto a aquellas no invaden (García-Barrera et al. 2010). También se ha observado que la supresión de la expresión de EAG1 en células de cáncer pulmonar disminuye la capacidad de éstas para metastatizar (Wullf et al. 2009). Por lo anterior, se sugiere que la expresión de EAG1 podría aumentar a medida que las células tumorales adquieren fenotipo maligno.

3.5 Posible regulación de la expresión de EAG1 por el factor de transcripción MYT1L

MYT1L es un factor de transcripción involucrado en la diferenciación neuronal. Al igual que EAG1, su expresión en tejidos sanos se restringe al cerebro, siendo débil su expresión en la periferia en los testículos (Kim et al. 1997). También se expresa de forma ectópica en gliomas (Musaka et al. 2004), al igual que EAG1. Debido a esta coincidencia espacial, es posible pensar que MYT1L está involucrado en la regulación transcripcional de EAG1. En adición, “río arriba” del extremo 5’ de la región codificante del gen *eagl* se encuentra una secuencia perfecta de unión de MYT1L al DNA (Figura 8).



Figura 8. Posible elemento de unión de MYT1L al DNA del extremo 5' de la región codificante del gen de EAG1. El posible elemento fue identificado usando el programa MatInspector (Cartharius et al. 2005).

Con base en lo anterior, se propone que una posible expresión ectópica de MYT1L en células tumorales de la periferia puede llevar a una expresión de EAG1, explicando así el por qué una proteína neuronal se encuentra en una variada gama de tumores diferentes a aquellos del sistema nervioso.

4

Justificación e Hipótesis

4.1 Justificación

El canal EAG1 se encuentra presente en un grupo amplio de tumores, y es posible que le confiera a las células tumorales algún tipo de ventaja selectiva con respecto a aquellas que no lo expresan, ya que su expresión se ha relacionado con la secreción de VEGF. Sin embargo, como muestran algunos antecedentes, también es posible que EAG1 se encuentre en diferentes tipos de células que componen el microambiente tumoral, y que esté regulado por los diversos factores que en él se encuentran. También es posible que la expresión del canal sea diferente en las células epiteliales transformadas a medida que éstas adquieren características de mayor malignidad. Con base en lo anterior, en el presente trabajo exploraremos la expresión del canal EAG1 en diferentes tipos de células y procesos que ocurren en el microambiente tumoral. Este trabajo, además de aportar información novedosa sobre la relación EAG1-cáncer, pretende abrir nuevas líneas de investigación que conduzcan a la comprensión del rol de EAG1 en la biología de células que componen el microambiente tumoral.

4.2 Hipótesis

La expresión génica de Eag1 se regula por factores asociados al microambiente tumoral (VEGF, citocinas, TGF- β) y se asocia al desarrollo de un fenotipo de malignidad.

5

Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar si algunos factores involucrados en el proceso de carcinogénesis y que también se encuentran presentes en condiciones fisiológicas tales como VEGF, citocinas presentes en el ambiente inflamatorio (TGF- β 1 y TNF α) y MYT1L regulan la expresión de EAG1.

5.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de VEGF en la expresión del gen *eag1* en células de endotelio vascular HUVEC.
- Evaluar la expresión del gen y de la proteína EAG1 en células dendríticas sometidas a estímulos inductores de su diferenciación y/o maduración como son el factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos (GM-CSF), interleucina 4 (IL-4), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la prostaglandina E2 y el lipopolisacárido (LPS).
- Estudiar la expresión del gen *eag1* y de la proteína durante un proceso de EMT inducido por TGF- β 1 en células tumorales
- Estudiar si el factor de transcripción MYT1L se encuentra presente en células tumorales de diferente histogénesis en las cuales se expresa el mRNA de *eag1*.

6

Métodos

6.1 Cultivos celulares

6.1.1 líneas celulares y medios de cultivo

A continuación se listan los diferentes tipos de líneas celulares y medios de cultivo utilizados en este trabajo

TABLA 1. Líneas celulares utilizadas para el desarrollo de este trabajo.

Nombre	Procedencia	Tipo	Medio de cultivo
HUVEC	ATCC	Endotelio vascular	DMEM
A549	ATCC	Adenocarcinoma de pulmón	Ham F12-K
SK-LU-1	ATCC	Adenocarcinoma de pulmón	RPMI
SK-MES-1	ATCC	Carcinoma Escamoso de pulmón	RPMI
CaLu-1	ATCC	Carcinoma epidermoide de pulmón	RPMI
A427	ATCC	Adenocarcinoma de pulmón	RPMI
1.3.11	INER	Adenocarcinoma de pulmón	RPMI
1.13.15	INER	Adenocarcinoma de pulmón	RPMI
MCF-7	ATCC	Adenocarcinoma de mama	RPMI
CHO	Instituto Max Planck	Ovario	F12-K

Todos los medios de cultivo fueron complementados con 10% de suero fetal bovino (SFB). Durante la expansión de las células endoteliales, éstas fueron cultivadas en medio F12-K complementado con 10% de SFB, heparina 0.1 ng/mL y suplemento de crecimiento endotelial (Gibco). Para el tratamiento con el factor de crecimiento endotelial vascular

(VEGF) las células HUVEC fueron cultivadas en su respectivo medio en ausencia de suero (Gric et al. 2004). El VEGF (Sigma) fue reconstituido en agua estéril de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Las concentraciones de VEGF usadas en los experimentos fueron de 50 ng/ml y 5 ng/ml de acuerdo a lo reportado por Gric et al. 2004. Para el tratamiento con TGF- β 1 las células A549 fueron cultivadas en su respectivo medio complementado con SFB (0.5%). El TGF- β 1 fue reconstituido de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La concentración de TGF β 1 fue de 7.3 ng/mL. Las células se mantuvieron a 37 °C, 5% de CO₂ y 85% de humedad.

6.1.2 Cultivo de células dendríticas

Se utilizaron concentrados leucocitarios procedentes de donadores sanos obtenidos del banco de sangre del hospital La Raza, siguiendo los lineamientos éticos locales. La sangre fue sometida a un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (Nycomed Pharma AS, densidad 1.077 g/L). Tras su centrifugación a 2,000 rpm durante 30 min, las células monocnucleares periféricas (PBMC, por sus siglas en inglés *peripheral blood mononuclear cell*) se recuperaron de la interfase entre el ficoll y el plasma. Los monocitos fueron aislados por selección positiva usando el sistema MACS (“Magnetic Cell Sorting”). Las PBMC fueron incubadas con un Ab anti-CD14 unidos a perlas magnéticas (Miltenyi Biotec) para obtener los monocitos CD14⁺.

6.2 RT-PCR

Tres técnicas de PCR fueron utilizadas para evaluar la expresión de *eagl* en los diferentes tipos celulares utilizados en este trabajo; ellas fueron: RT-PCR de punto final, de tiempo real y Southern blot, la cual tiene como base la PCR. EL procedimiento seguido se describe en las siguientes secciones.

6.2.1 PCR de punto final

Los iniciadores (*primers*) utilizados para la realización de las diferentes PCR's fueron los siguientes:

TABLA 2. Secuencia de los iniciadores utilizados en las reacciones de PCR

Templado	Dirección	Secuencia
Heag1	Sentido	GCTTTTGAGAACGTGGATGAG
	Antisentido	AAGAGATACGGTGGTAGAAGC
Vimentina	Sentido	CCACCAAAGTCACGCTGAA
	Antisentido	TGCTTGGATTCCAGAAACG
E-Caderina	Sentido	AAAGTGTGGCTGCCAAGAAC
	Antisentido	AGCCTCAGAGAGAGGTCAGCAA
HPRT	Sentido	CGACGAGCCCTCAGGCGAAC
(Hipopoxantina-guanina fosforibosiltransferasa)	Antisentido	CGGGTCGCCATAACGGAGCC
Ciclofilina	Sentido	CCCCACCGTGTTCTTCGACAT
	Antisentido	AGGTCCTTACCGTTCTGGTCG
MYT1L	Sentido	GACCTCAGCATGAACAAGCA
	Antisentido	CTTGAGTTCTTGGGAGCTGG

La extracción de ARN fue realizada con el método de trizol-cloroformo. Un ml de trizol fue añadido a la botella de cultivo y el lisado obtenido tratado con 200 µl de cloroformo para seguidamente ser centrifugado a 12000 rpm por 30 min a 4 °C. El sobrenadante que se obtuvo fue tratado con 500 µl de isopropanol y centrifugado en las condiciones ya descritas. El botón obtenido se lavó con 1 ml de etanol (grado biología molecular) y el ARN extraído se resuspendió en agua tratada con DEPC. La cuantificación del ARN extraído se calculó de acuerdo a la ecuación:

$$[\text{ARN}] = \lambda_{260\text{nm}} * 500 (\text{Factor de dilución}) * 40 / 1000$$

La absorbancia a 260nm de longitud de onda se midió en un espectrofotómetro Beckman DU-6.

Con el fin de evitar falsos positivos por amplificación del segmento diana a partir del DNA genómico, se hicieron reaccionar 20 µg del ARN extraído con 2 o 4 µl de DNAasa I (Invitrogen). El volumen final de la reacción fue de 20 µl. El protocolo de tiempos y temperaturas en el termociclador (Perkin Elmer) fue el siguiente: 37 °C por 30 min para activar la enzima; 72 °C por 5 min para desactivarla y detener la reacción, y un periodo de enfriamiento a 4 °C por 30 min.

5 µl del producto de la reacción anterior (equivalente a 5 µg de ARN) se hicieron reaccionar con la reversotranscriptasa MMuLV (Applied Biosystems). La reacción se completó con los siguientes reactantes: Buffer 10X (Applied Biosystems), desoxinucleótidos (10 mM) (dNTP's), iniciador (oligo DT), RNAasa out (Invitrogen), y agua-DEPC. El volumen final de reacción fue de 20 µl. El protocolo de tiempo y temperaturas fue el siguiente: 60 °C por 7 min para el alineamiento del iniciador con el MRNA; 37 °C por 60 min para la activación de la MMuLV; 70 °C por 15 min para la desactivación de la enzima y un periodo final de enfriamiento a 4 °C.

5 µl del producto de la reacción anterior se hicieron reaccionar con la polimerasa de DNA dirigida por DNA, Taq Polimerasa (Invitrogene). Los demás reactantes fueron: Buffer 10x con magnesio, DMSO, iniciadores (*primers*) de acuerdo el cDNA a amplificar, dNTP's y agua. El agua utilizada en las reacciones fue tratada con DEPC o agua libre de nucleasas. El volumen final de la reacción fue de 25 µl. El protocolo

de tiempos y temperaturas para Heag1, MYT1L y ciclofilina fue el siguiente: 94 °C por 1 min para la desnaturalización del DNA, 60 °C por 45 seg para el alineamiento de los iniciadores y 72 °C por 50 seg para la elongación de los productos. Este ciclo de tiempos y temperaturas se repitió 30 veces. Para vimentina y E-caderina la temperatura de alineamiento de los iniciadores fue de 58 °C. Muestras con el RNA aislado y no retrotranscrito o con agua-DEPC fueron utilizadas como controles de especificidad. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.2%.

6.2.2 Southern blot

Los experimentos de regulación de la expresión de *eag1* en células HUVEC requirieron la realización de Southern blot. Este se efectuó de la siguiente manera: el gel con los amplicones de *eag1* y ciclofilina A fue sometido a un lavado de 30 min con una solución desnaturalizante. Finalmente, el gel fue puesto en una cámara de transferencia conteniendo un buffer alcalino en la cual los amplicones son barridos y atrapados por una membrana de nylon a medida que la solución sube por capilaridad a través de una pila de papel filtro y papel absorbente (figura 9).

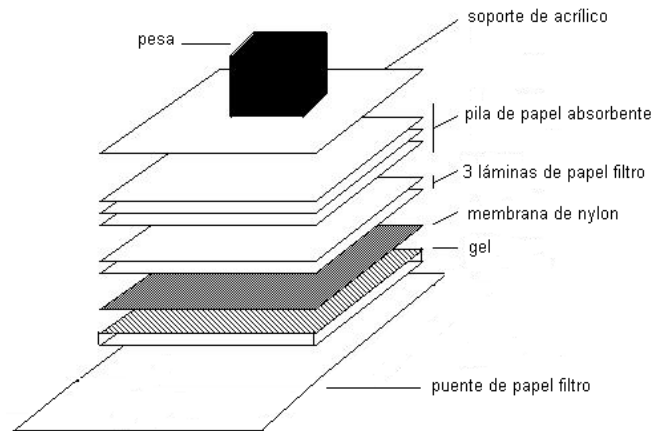


Figura 9. Transferencia de los productos de PCR a la membrana de nylon. Montaje necesario para la transferencia por capilaridad de los amplicones a una membrana de nylon. Una vez transferidos los amplicones a la membrana de nylon, fueron fijados mediante exposición de la membrana a luz ultravioleta por 12 segundos. Para evitar fijaciones inespecíficas de la sonda (*Background*) la membrana permaneció en contacto con una solución pre-hibridizante por 1.5 h a 68 °C. Para la hibridación se utilizó una sonda de 475 pb para *eag1* y una de 453 pb para ciclofilina A marcadas con fósforo radioactivo (^{32}P). El marcaje de la sonda se realizó con el equipo *Rad Prime DNA Labeling System*TM (Invitrogen). La hibridación se efectuó durante toda la noche a una temperatura de 68 °C. El marcaje radioactivo de la sonda fue realizado por personal capacitado y certificado en el manejo de este tipo de materiales.

Los productos del marcaje fueron revelados en películas Kodak *Medical x-Ray General Purpose Blue* (MBX #referencia 6040331). El análisis densitométrico se realizó en el programa LabWorks™ Versión 4.5 (UVP Bioluminescence Systems) (Figura 10). La densitometría de los productos de vimentina y E-Caderina con relación a HPRT se realizaron en el programa LabWorks™ Versión 4.5 (UVP Bioluminescence Systems). Los resultados son expresados como el cociente de los valores normalizados de las densidades ópticas de eag1 y ciclofilina. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó la prueba *t* de Student no pareada. Este análisis se realizó en el programa GraphPad Prism 4.



Figura 10. Esquema de medición de la densidad óptica. Mediante el programa *LabWorks*. Las áreas reconocidas por la sonda son delimitadas (cuadro rojo) y calculadas sus densidades ópticas. La densidad óptica se calcula de acuerdo a la ecuación presente en la figura.

6.2. PCR en tiempo real

El cDNA de eag1, GAPDH (Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa) y HPRT fueron preparados de la manera descrita en la sección 4.2.1. La detección de eag1 en DC se realizó con el sistema *Universal Probe Library* (Roche). Para la reacción de PCR se utilizó el par de iniciadores descritos en la tabla 1 y la sonda número 49 del *Universal Probe Library*. GAPDH fue utilizado como gen de referencia. Para la detección de eag1 en las líneas celulares de cáncer de pulmón se utilizó una sonda TaqMan® (Applied Biosystems). HPRT fue utilizado como gen de referencia. Muestras con el RNA aislado y no retrotranscrito o con agua-DEPC fueron utilizadas como controles de especificidad. El análisis de los datos se realizó mediante la técnica de curva estándar.

6.3 Citometría de Flujo

6.3.1 Anticuerpos utilizados

A continuación se listan los anticuerpos utilizados en este trabajo:

Anticuerpos primarios

mAb-62

Dr. Walter Sthümer, Instituto Max Planck

Anticuerpo monoclonal preparado en ratón, dirigido contra la región poro de EAG1. No presenta reacción cruzada con EAG2. Usado para inmunoprecipitación e inmunofluorescencia (Hammerlein et al.2006). Un anticuerpo de ratón IgG2bk fue utilizado como control de isotipo.

Anti-CD1a

BD Pharmingen_

Anticuerpo monoclonal preparado en ratón, conjugado con Fluoresceína (FITC). Usado para citometría de flujo.__

Anti-CD86

BD Pharmingen_

Anticuerpo monoclonal preparado en ratón, conjugado con Fluoresceína (FITC). Usado para citometría de flujo.__

Anti-CD205

BD Pharmingen_

Anticuerpo monoclonal preparado en ratón, conjugado con Fluoresceína (FITC). Usado para citometría de flujo.__

Anti-HLA-DR

BD Pharmingen_

Anticuerpo monoclonal preparado en ratón, conjugado con ficoeritrina (PE). Usado para citometría de flujo.

Anticuerpos Secundarios

Goat anti-mouse Dako

Anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón, preparado en cabra, conjugado con fluoresceína (FITC). Usado en citometría de flujo.

6.3.2 Procedimiento

10⁵ DC o células A549 fueron cultivadas en cajas de 96 pozos. Ambos tipos celulares fueron fijados y permeabilizados con el kit Citofix/Citoperm (BD PharMingen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células dendríticas se incubaron por 1 h a 4 °C con los anticuerpos anti-CD1a para determinar su diferenciación a partir de células mononucleares de sangre periférica, o anti CD83, CD205, HLA-DR y CD86 para determinar su maduración. Para determinar la expresión de EAG1 en DC y A549 se incubaron con el mAb-62 (1:50) o con su respectivo control de isotipo (1:50) por 1 h, a 4 °C. Terminado este tiempo, las células fueron incubadas con el Goat anti-mouse FITC (1:100) por 60 min a 4 °C. Las medidas de fluorescencia fueron tomadas en un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson) y analizadas con el programa WinMDI 2.9.

6.4 Inmunocitoquímica

6.4.1 Tinción con peroxidasa

Las DC fueron fijadas mediante un breve lavado con etanol (96%). Los portaobjetos fueron sumergidos en un buffer con EDTA [0.01 mol/L (pH 8.0)] y calentados con el objetivo de recuperar el antígeno. La preparación fue tratada con peroxidada endógena y bloqueador de fosfatasas (Dako) y se incubó por 1 h con el mAb-62 (1:100) a temperatura ambiente. La preparación fue entonces incubada con *MACH 4 mouse probe* (Biocare) en TBS/Tween por 10 min e incubados con *MACH horseradish peroxidase polymer* (Biocare) en TBS/Tween por 10 min. La reacción de tinción específica se completó incubando la preparación con buffer de reacción (Dako) en presencia de diaminobencidina. La contratinción se realizó con hematoxilina (Dako). La preparación se observó con un microscopio Nikon Eclipse

E600 usando un Nikon Plan Apo en un objetivo de 40X. Las imágenes fueron adquiridas con una cámara DMX1200 y un programa de adquisición de imágenes Nikon ACT-1.

6.4 Electrofisiología

Las DC fueron sembradas en cubreobjetos cubiertos con poli-L-lisina. Los registros electrofisiológicos fueron realizados en la configuración de célula completa (*whole cell*) de *patch-clamp* usando un amplificador EPC-9 (HEKA *electronics*) y analizados con el programa Igor Pro (WaveMetrics). Las pipetas fueron hechas de capilares Kimax y tuvieron una resistencia de entre 2-3 MΩ. La solución interna presentó la siguiente composición (mmol/L): 140 KCl, 10 EGTA y 10 HEPES/KOH (pH 7.2). La solución externa tuvo la siguiente composición (mmol/L): 2.8 KCl, 115 NaCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, y 10 HPES/NaOH (pH7.2).

En todos los registros el potencial de mantenimiento (*holding potencial*) fue de -80 mV. En este potencial la probabilidad de encontrar un canal EAG1 en estado cerrado es muy alta. Para promover las corrientes de potasio a través de EAG1 se utilizó una rampa de -80 a +120 mV por 250 ms. Para observar el marcado desplazamiento Cole-Moore característicos de EAG1, previo a un pulso de prueba (que promueve las corrientes de potasio a través de EAG1) a +60mV, se llevó el potencial de membrana a un valor muy negativo (-140mV) o a uno menos negativo (-60mV) por 500 ms.

6.5 Ensayo de migración celular (*Scratch assay*)

La migración de células A459 fue estudiada mediante un ensayo denominado Scratch assay (Liang et al. 2007). Las células fueron sembradas en cajas de 24 pozos en medio Ham F12-K suplementado con SFB10% y mantenidas en él hasta alcanzar confluencia. La monocapa formada fue dividida en dos partes utilizando la punta de una pipeta de 200 μL. Seguido, se retiró el medio y se lavó dos veces con PBS para remover las células que se encontraban en suspensión. Posteriormente, se adicionó el medio deficiente en SFB (0.5%) y TGF-β1 de acuerdo al tratamiento a aplicar. Las células se cultivaron en las determinadas condiciones

experimentales (con o sin TGF β 1) por 48 h. Al finalizar este tiempo, los pozos fueron analizados en un microscopio de contraste de fase Olympus DP70.

7

Resultados

7.1 Regulación de la expresión de *eag1* por VEGF en células HUVEC.

Como se mencionó en la sección de “antecedentes directos”, un conjunto de experimentos mostraban que VEGF disminuía el nivel de expresión de *eag1* en células HUVEC cuando éstas eran incubadas con la citocina por un tiempo de 24 h. Un solo experimento indicaba que esta situación también podía ocurrir cuando VEGF estaba en el medio de cultivo por 48 h. Así, durante la primera parte de este trabajo se completaron las replicas experimentales que permitieron concluir sobre este importante punto.

La intensidad de las bandas muestra claramente que la expresión del mRNA de *eag1* se incrementa en las células HUVEC cultivadas en DMEM sin SFB (48 h) con respecto a aquellas mantenidas en DMEM con SFB 10% (control). Sin embargo en aquellas cultivadas en DMEM sin SFB pero con VEGF (5 ng/mL), el nivel de expresión de *eag1* es similar al observado en las células bajo condiciones control. El nivel de expresión de *eag1* en las células cultivadas en presencia de la citocina fue significativamente menor al observado en las HUVEC mantenidas en ausencia de suero (figura 11).

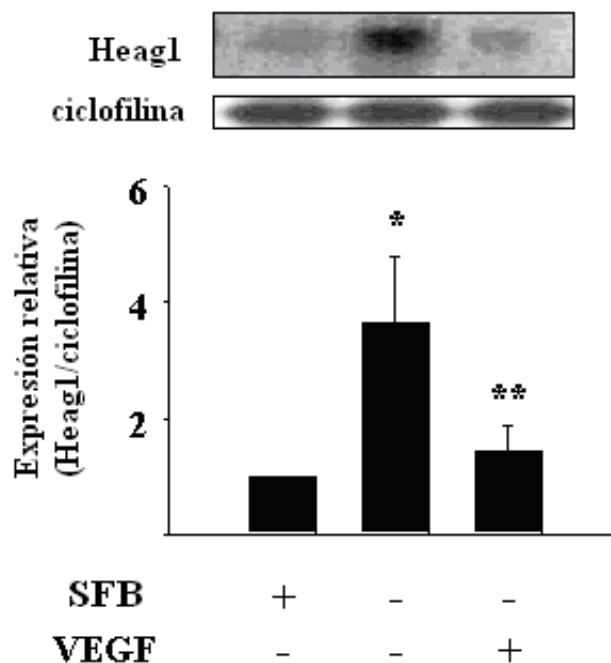


Figura 11. Regulación de la expresión del MRNA de heag1 por VEGF (48 h) en células HUVEC. *Arriba:* Southern blot. La banda más intensa corresponde al DMEM sin suero. *Abajo:* Densidades ópticas promedio de tres experimentos independientes mostrando que el VEGF modula la expresión de *eag1* en células HUVEC. Se observa como VEGF 5 ng/ml disminuye significativamente la expresión de *eag1* en HUVEC cultivadas en ausencia de SFB en el medio de cultivo. SE, n= 3, *P< 0.05, **P< 0.01.

7.2 Expresión de EAG1 en células dendríticas

Después de 7 días de tratamiento con IL-4 y GM-CSF se obtuvieron células con un árbol de prolongaciones citoplasmáticas que recuerdan la “forma de estrella” típica de las DC (figura 12).

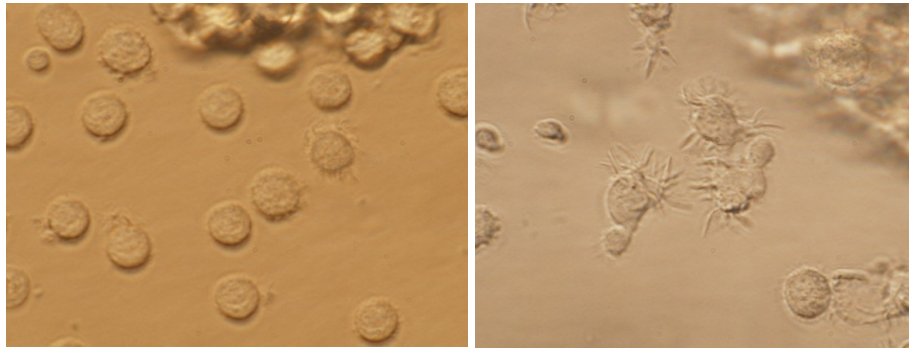


Figura 12. Células mononucleares y dendríticas en cultivo. *Izquierda:* Células mononucleares obtenida de sangre periférica de pacientes sanos. *Derecha:* Células dendríticas obtenidas después de tratamiento con IL-4 y GM-CSF.

Para corroborar que efectivamente se habían obtenido DC inmaduras a partir de células mononucleares de sangre periférica, se estudió la expresión de la molécula de superficie CD1a, una moléculas de presentación antigénica no polimórfica encargada de la presentación de antígenos no-peptídicos (Abbas et al. 2002), que es comúnmente usada para la identificación de DC inmaduras en cultivo. Como era esperado, la mayoría de las células en el cultivo presentaban el marcador CD1a. Junto con CD1a, se midió la expresión de la molécula CD14, la cual es característica de los precursores monocíticos de las DC, pero está ausente en estas últimas. El marcador se reducía considerablemente o se encontraba ausente después del tratamiento con IL-4 y GM-CSF (figura 13). Este marcador fue medido en cada experimento para verificar que efectivamente se estaba trabajando con DC. En su estado maduro, la mayoría de células dendríticas expresan altos niveles de proteínas de superficie encargadas de la estimulación del linfocito (i.e. CD86), así como de moléculas presentadoras de antígeno del tipo MCH de clase II. También destaca el incremento en la expresión de la proteína de superficie CD83, de función desconocida (Abbas et al. 2002) y que es utilizada como marcador de DC maduras. Por esto, se observó si tal incremento se presentaba en las DC una vez cultivadas con dos diferentes estímulos de maduración, TNF α /PGE2 o LPS. Como muestra la figura 14, un alto porcentaje de células dendríticas expresaban en su superficie las moléculas CD86 y HLA-DR, lo que indicó que se estaba trabajando con un grupo de DC maduras.

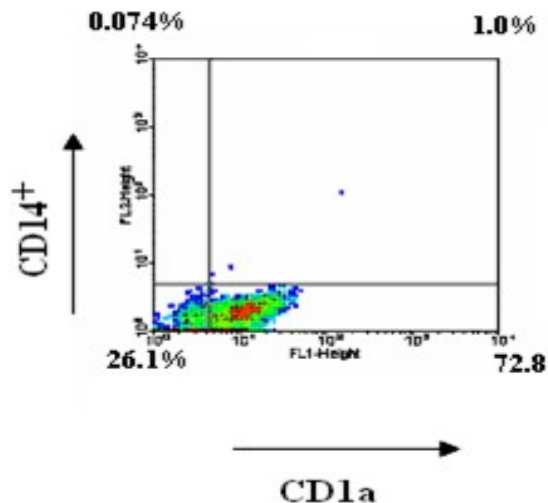


Figura 13. Expresión de CD1a, CD14⁺. El citograma muestra como CD1a está presente en el 72% de la población de células en cultivo, mientras CD14⁺ se encuentra en apenas 0.074% de las células.

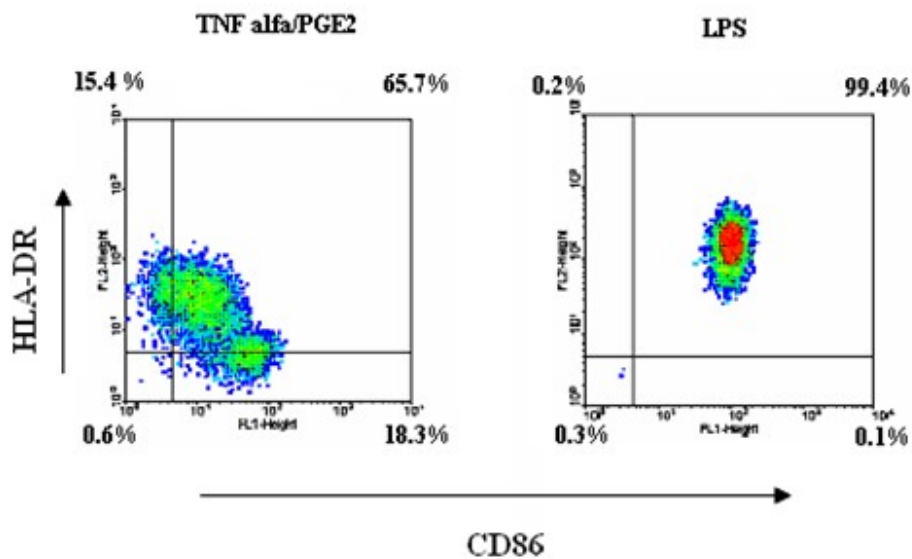


Figura 14. Expresión CD86 y HLA-DR en DC maduras con TNF- α /PGE2 o LPS. La mayoría de la población expresa las moléculas HLA-DR y CD86, indicando su maduración.

En concordancia con los resultados de microarreglos del sistema GEO (*Gene Expression Profiles (GEO)* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>, Octubre 2010), fue posible detectar mediante RT-PCR en tiempo real el mRNA de *eagl* en DC inmaduras y en aquellas maduras con TNF α /PGE2 o LPS. No se observaron diferencias significativas en los puntos de detección (Ct's) entre el grupo de DC inmaduras y el grupo de maduras. Es de resaltar que a pesar del elevado número ciclos usados en la PCR, no se detectó el mRNA de *eagl* en las células mononucleares precursoras CD14⁺ (Figura 15).

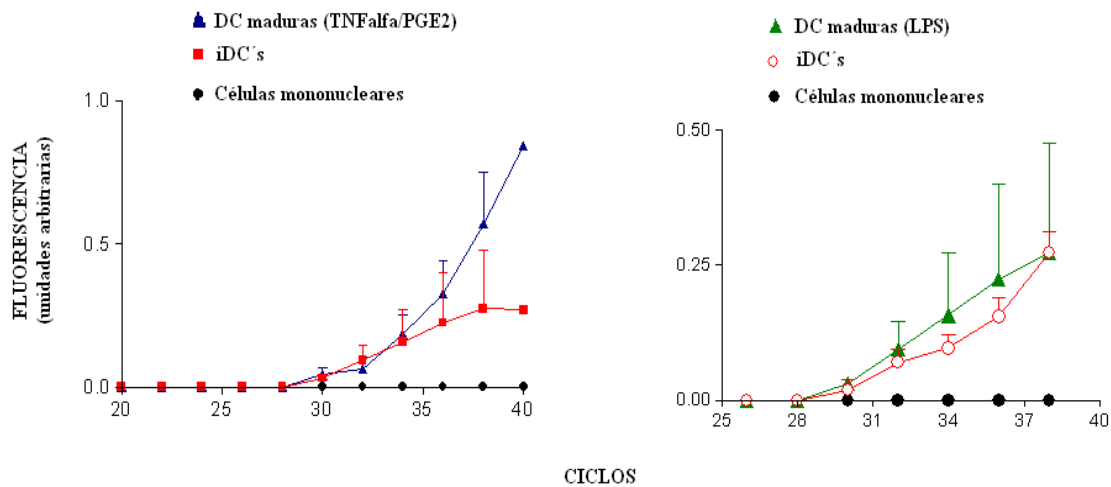


Figura 15. Expresión de *eagl* en monocitos y DC inmaduras y maduras. Como estímulo de maduración para las DC se utilizaron TNF α /PGE2 (izquierda) o LPS (derecha). SE, n = 3.

7.2.2 EAG1 se encuentra en el núcleo de las células dendríticas

Una vez detectado *eagl* en DC, el siguiente objetivo fue determinar si éste formaba un canal funcional en este tipo celular. Inicialmente, mediante una rampa de voltaje se observó una corriente saliente posiblemente producto de la activación de canales de potasio (figura 16A). Como se mencionó con anterioridad, las corrientes de potasio que fluyen a través de EAG1 se caracterizan por presentar un marcado retardo en su activación cuando la célula es

mantenida en potenciales de membrana muy negativos (efecto Cole-Moore; figura 16B). Así que se buscó esta característica en las corrientes registradas en las DC inmaduras; sin embargo, cuando se utilizó un pulso a potenciales muy negativos antecedido un pulso de prueba a +50 mV no se observó corriente alguna presentando el efecto Cole-Moore (figura 16C).

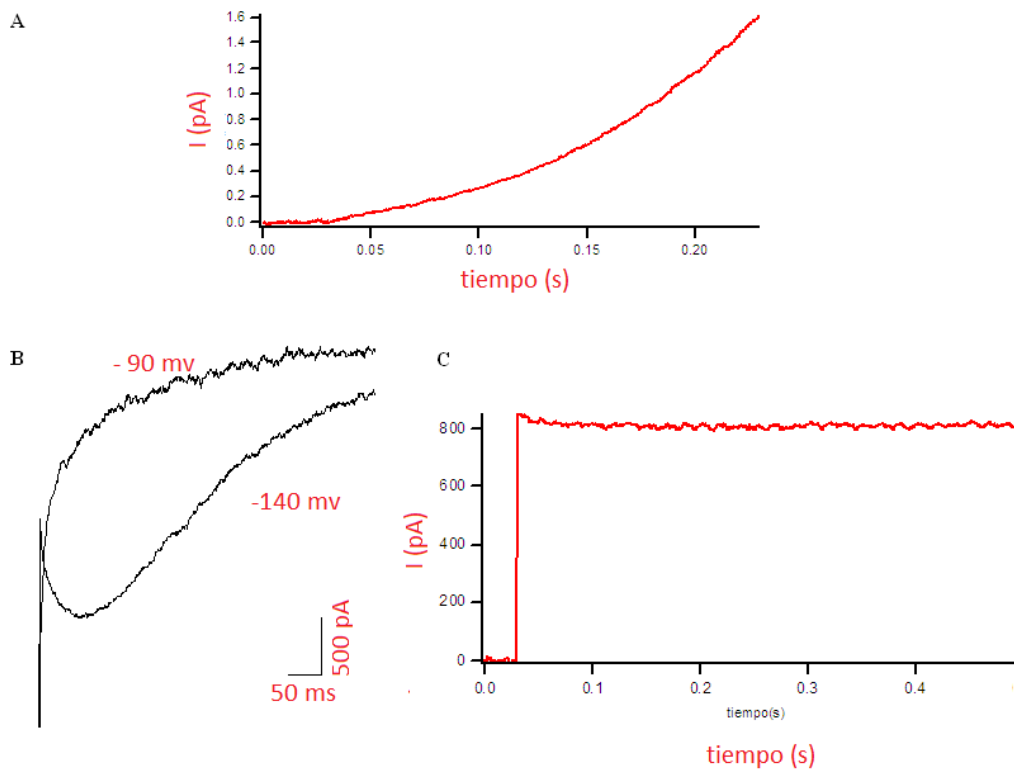


Figura 16. Las células dendríticas carecen de corrientes EAG1. A) Corriente saliente registrada en células dendríticas inmaduras. B) Efecto Cole-Moore en la corriente de potasio que fluye a través de canales EAG1 transfectados en células CHO. Se observa cómo la corriente que activa con mayor lentitud es aquella cuyo pulso de prueba a +50 mV es antecedido por un potencial de -140 mV. C) No se observa el efecto Cole-Moore en las corrientes registradas en las células dendríticas inmaduras.

¿Es posible que no se registren corrientes de EAG1 debido a que éste se encuentra en un lugar diferente a la membrana plasmática? Esta posibilidad surgió del hecho de que EAG1

presenta una señal de localización nuclear en su segmento carboxilo terminal y además su correcto tráfico a la membrana celular depende de modificaciones post-traduccionales que de no efectuarse inducen su acumulación citoplasmática en zonas cercanas al núcleo (Napp 2005). Los bloqueadores del canal astemizol e imipramina no tuvieron ningún efecto en el proceso de diferenciación de las DC. De esta forma, mediante inmuno-tinción con el mAb62, buscamos la localización de EAG1 en las DC inmaduras. En algo novedoso dentro de la investigación de EAG1, se observó que la señal del anticuerpo coincide con la localización del núcleo de la célula (figura 17).

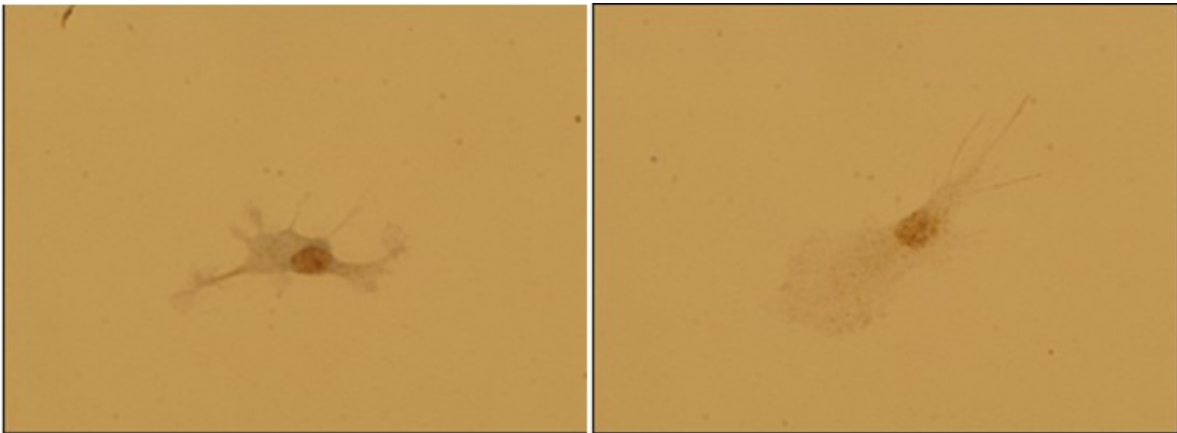


Figura 17. EAG1 se encuentra presente en el núcleo de las células dendríticas. Se puede observar claramente la intensa tinción café en los núcleos de las células dendríticas que indica la presencia del canal en esta estructura subcelular.

7.3 Expresión de *eag1* en líneas celulares de cáncer de pulmón y durante el proceso de transición epitelial a mesenquimal (EMT)

7.3.1 Expresión del mRNA de *eag1* en líneas celulares de cáncer de pulmón

Las células A549 presentaron la más alta expresión del mRNA de *eag1* en comparación con las líneas CaLu-1 y SK-MES-1 (carcinoma escamoso). Tal expresión fue aproximadamente 6 veces superior que el observado en las células CaLu-1 y 5 veces el observado en SK-MES.1 (figura 18A). Es interesante observar que no hay una expresión homogénea de *eag1*

en el grupo de células provenientes de adenocarcinomas. El más alto nivel de expresión fue observado en la línea SK-LU-1; éste fue aproximadamente 10 veces más alto que el medido en A549 (figura 18B). Por otro lado, las líneas celulares 1.3.11, 1.3.15 y A427 no expresaron *eag1* después de 33 ciclos de reacción.

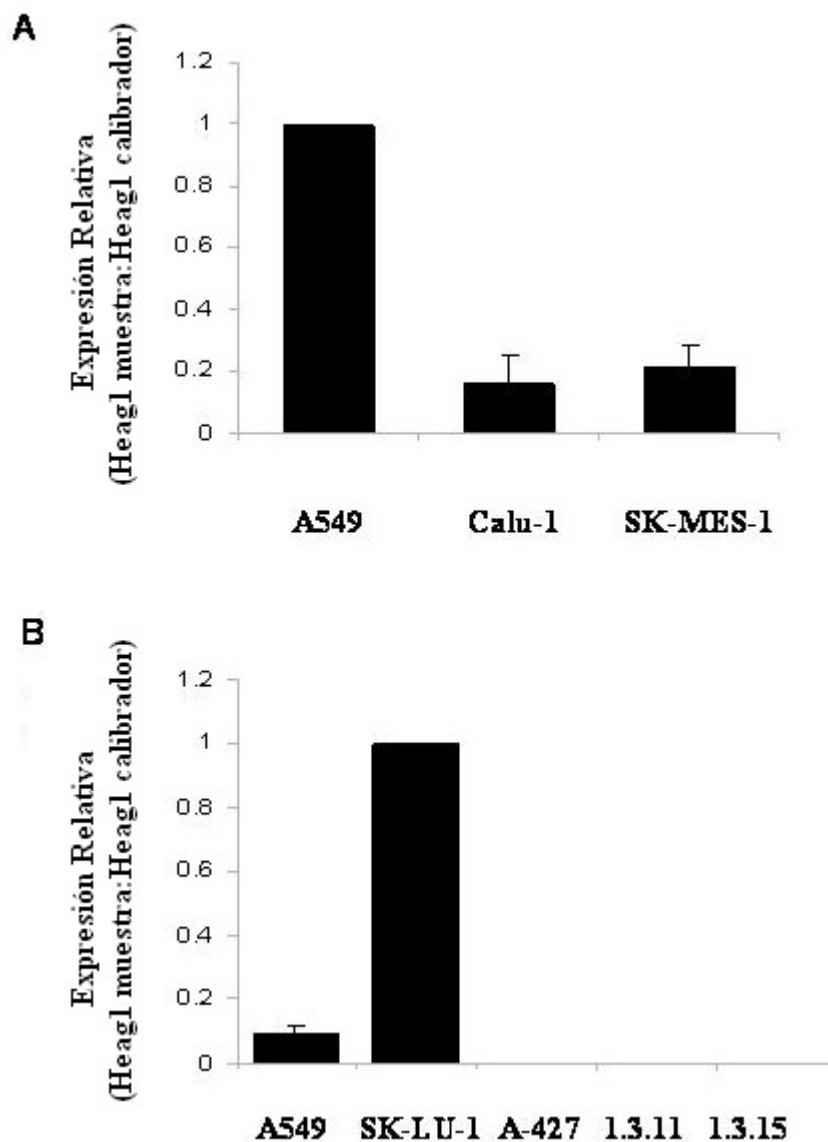


Figura 18. Expresión de *eag1* en líneas celulares de cáncer de pulmón. A) La expresión del canal es más alta en la línea A549 que en las líneas de Calu-1 y SK-MES-1. SE; n = 3; p < 0.05, Calibrador: A549. B) Expresión de *eag1* en líneas de adenocarcinoma de pulmón. Solo en las líneas SK-LU-1 y A549 fue detectado el mensajero del canal. SK-LU-1 mostró la más alta expresión de *eag1*. SE, n = 3; p < 0.05; calibrador: SK-LU-1.

7.3.2 Expresión de EAG1 durante un proceso de transición epitelial a mesenquimal (EMT).

Con el objetivo de inducir un proceso de transición epitelial a mesenquimal (EMT), las células A549 fueron tratadas con TGF- β 1 por un tiempo de 48 h como se ha reportado con anterioridad (Kasai et al. 2005; Kim et al. 2007). Durante la EMT las células epiteliales cambian su morfología de tipo “cuboide” por una alargada de tipo “fibroblastoide”. Como era esperado, las células tratadas con TGF- β 1 presentaron una morfología fibroblástica; en contraste, las células no tratadas mantuvieron su morfología epitelial (Figura 19).

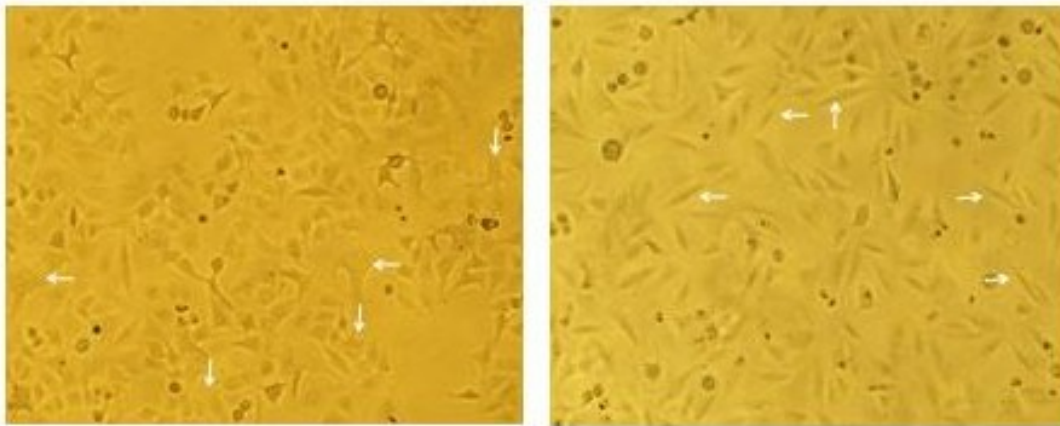


Figure 19. Cambio en la morfología de las células A549 tratadas con TGF- β 1. Las células cultivadas en ausencia de la citocina presentan una morfología epitelial (*izquierda, flechas*). En contraste, aquellas cultivadas en presencia de TGF- β 1 adquieren una morfología alargada de tipo fibroblasto. Aumento = 200X.

La disminución en la expresión de la proteína de adhesión celular E-caderina y el aumento del microfilamento vimentina son características de EMT (Zeisberg et al. 2009). Las células tratadas con TGF- β 1 mostraron una expresión disminuida de E-caderina y un aumento en la expresión de vimentina con respecto a las A549 no tratadas (figura 20A). Es también característico de las células A549, durante una EMT, un incremento en la capacidad migratoria. Para evaluar este aspecto se utilizó un ensayo de denudación mecánica (*Scratch assay*) como ha sido reportado (Liang et al. 2008). Se observó que en las células cultivadas en presencia de TGF- β 1 el área denudada estaba casi completamente restaurada (figura

20B), lo cual sugiere fuertemente que la capacidad para migrar está aumentada en las células A549 tratadas con TGFβ1.

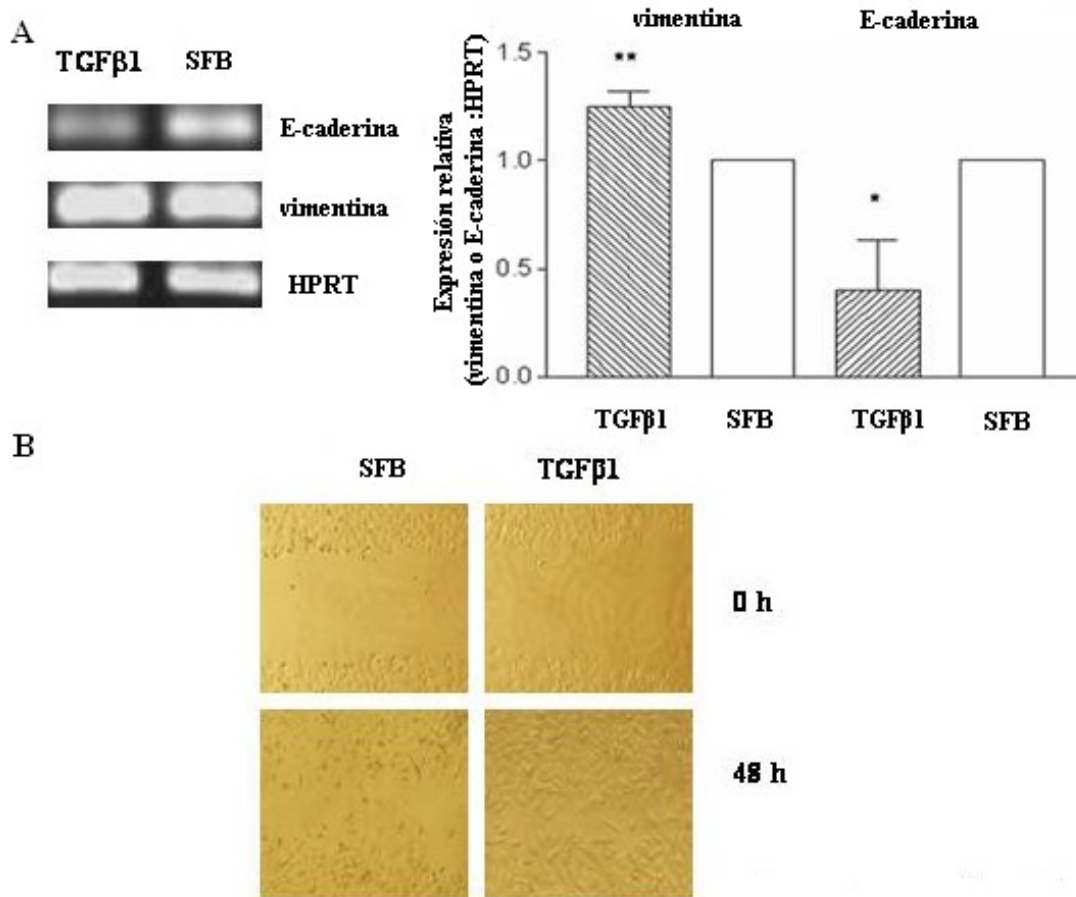


Figura 20. Modificaciones en la expresión génica y del marcador mesenquimal vimentina y E-caderina, así como de la capacidad migratoria de las células A549 tratadas con TGF-β1. A) *izquierda*: Expresión de vimentina y E-caderina en células tratadas (TGFβ1) o no tratadas (SFB); *Derecha*: niveles de expresión de vimentina y E-caderina *P < 0.05, **P < 0.01, SE, n = 5). B) *Scratch assay* en presencia o ausencia (SFB) de TGF-β1 a 0 y 48 h de tratamiento. Las células tratadas con TGF-β1 muestran mayor capacidad migratoria. Aumento = 200x.

El conjunto de resultados anteriores indica que el tratamiento con TGF-β1 induce una transición epitelial a mesenquimal. Una vez confirmado este punto, se investigó la expresión de eag1 a nivel de mRNA y proteína durante la EMT.

Los experimentos de RT-PCR en tiempo real muestran que la expresión del gen *eag1* se incrementa durante EMT (figura 21).

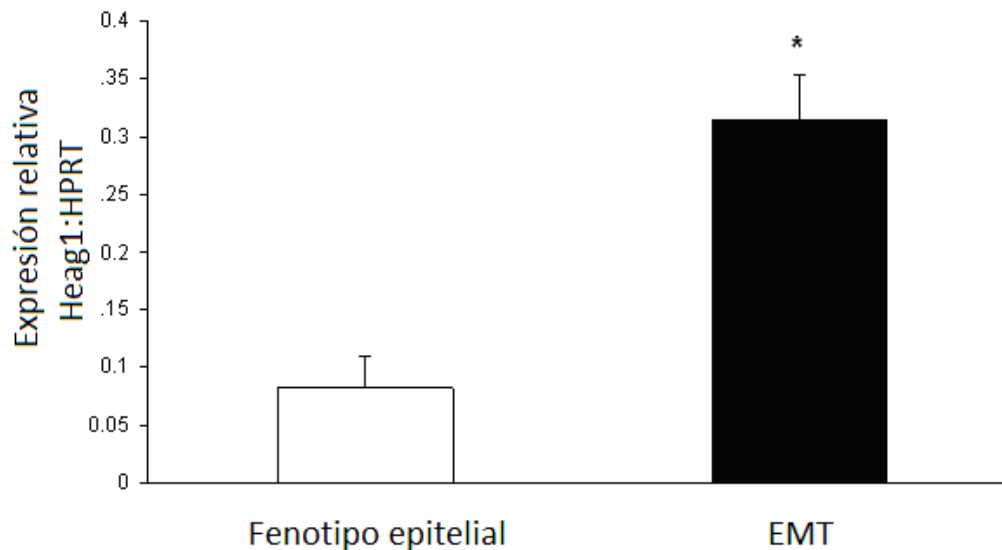


Figura 21. Expresión génica de *eag1* en células A549 durante la EMT. Las células que se encuentran en EMT presentan un aumento significativo en la expresión de *eag1* comparado con aquellas que conservan el fenotipo epitelial. SE, n=4, P<0.05.

Confirmada la expresión a nivel génico, se procedió a buscar la proteína mediante citometría de flujo. Para detectar EAG1 se utilizó un anticuerpo monoclonal específico contra la proteína en cuestión (mAb 62) diseñado por el grupo de medicina molecular dirigido por el Dr. Walter Sthümer en el instituto Max Planck. Este anticuerpo ha sido usado para la detección de EAG1 por inmunofluorescencia. Con este antecedente seguimos un protocolo de detección de proteínas por citometría de flujo para evaluar la presencia de EAG1 en las células A549 tratadas con TGF- β 1.

En células de Ovario de Hamster Chino (CHO), las cuales no expresan EAG1, no hubo diferencias en las señales de fluorescencia detectadas para el mAb62, el control de isotipo (IgG 2kb) y el anticuerpo secundario (anti-mouse Goat FITC), como lo muestra la figura 22. Por el contrario, en la línea celular de cáncer pulmonar A549, en donde ya ha sido detectado el mRNA de *eag1* (Díaz et al. 2009), se observa un incremento significativo en la

fluorescencia media de las células incubadas con el mAb62 con respecto a aquellas incubadas con el control de isotipo o con el anticuerpo secundario. En adición, cuando se incubaron las A549 con el mAb62 y el epítipo contra el cual fue diseñado, la fluorescencia media fue menor con respecto a la observada en las células incubadas únicamente con el mAb62 (Figura 22). Estos resultados indican que el mAb62 interacciona con el epítipo de EAG1, como fue diseñado, y reconoce de manera específica a EAG1.

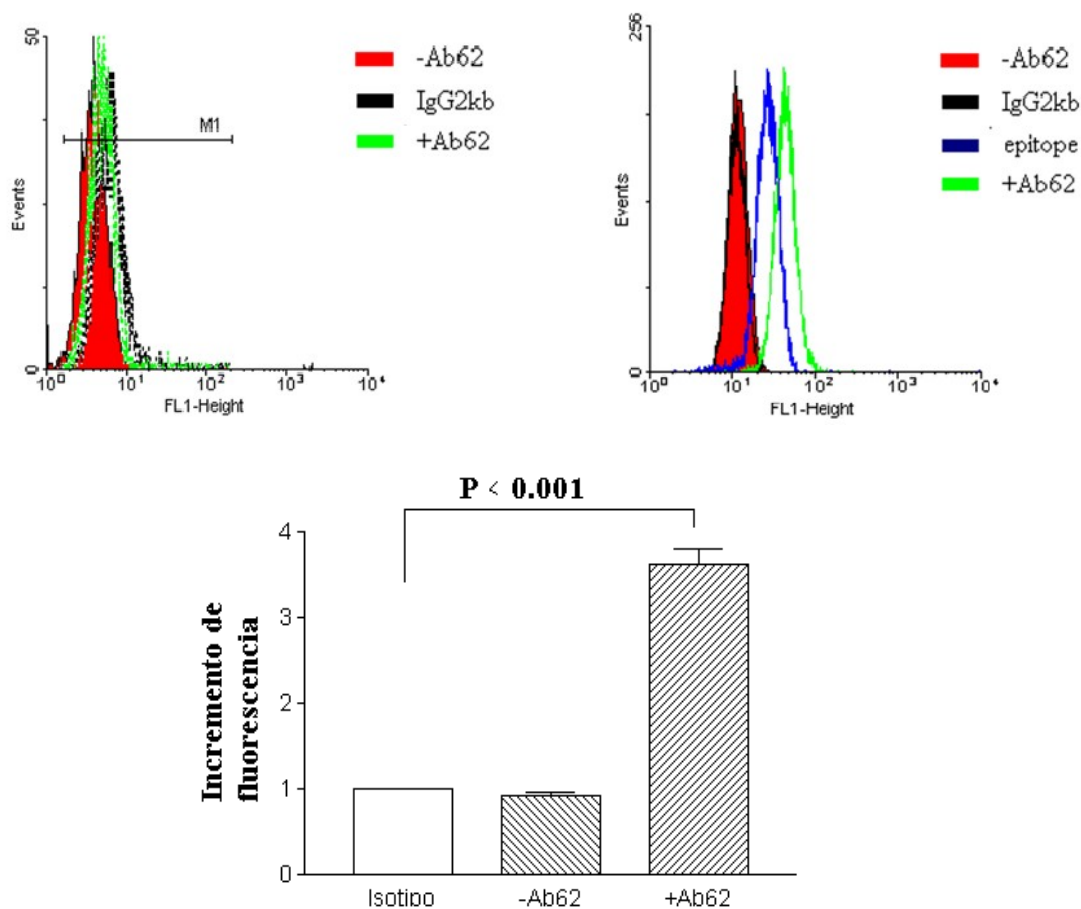


Figura 22. Validación del mAb62 para la detección de EAG1 mediante citometría de flujo. Arriba: la superposición de señales procedentes del mAb62, IgG2κb (isotipo) y el anticuerpo secundario (-Ab62) indica la ausencia del canal en células CHO (izquierda). En A549 es claro el incremento en la fluorescencia media en las células incubadas con el mAb62 con respecto al isotipo y el secundario (derecha). Abajo: El incremento en la

fluorescencia media en A549 incubadas con mAb62 es de casi 4 veces con respecto al isotipo. SE, n=3.

Una vez validada la citometría de flujo como una técnica adecuada para detectar EAG1 se procedió a evaluar su expresión en las células A549 bajo tratamiento. Los resultados indican que la intensidad media de fluorescencia normalizada es superior en células que se encuentran en un proceso de EMT que aquellas que no lo están (figura 23).

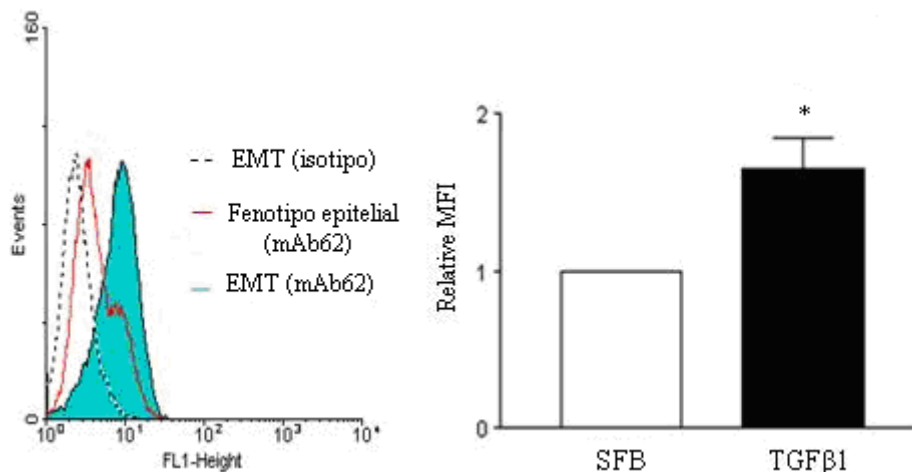


Figura 23. Expresión de la proteína EAG1 en células A549 durante EMT. A) Derecha: Se evaluó la presencia de EAG1 mediante citometría de flujo. La fluorescencia media es claramente más alta en células que se encuentran en EMT que en aquellas que conservan el fenotipo epitelial. La fluorescencia media también es más alta comparada con aquellas que presentan un fenotipo característico de EMT pero fueron incubadas con el control de isotipo del (mAb62).

En concentraciones en las cuales se consigue el bloqueo de EAG1 el astemizol no tuvo ningún efecto en la EMT de las células A549.

7.4 Regulación de la expresión de *eag1* por el factor de transcripción MYT1L (Myelin Transcription Factor Like-1)

Mediante RT-PCR se observó que, al igual que en cerebro, en testículos y en gliomas, MYT1L se expresa en tumores de la periferia en los cuales se expresa EAG1. La expresión

de MYT1L en las líneas celulares MCF-7 (cáncer de mama), A549 (cáncer de pulmón) y CaCu (cáncer de cervicouterino), las cuales presentan una expresión endógena de *eag1*, fue negativa (figura 24A). Las otras líneas de cáncer cervical SiHa y C33A, también fueron negativas (figura 24B). Solo una tenue amplificación del cDNA de MYT1L fue posible, en primera instancia, en muestras de mRNA de tumores de retinoblastoma. Un posterior análisis demostró diferencias en la expresión de MYT1L en el conjunto de mRNA provenientes de retinoblastomas (figura 21C). Esto posiblemente es producto de diferencias en la evolución del tumor.

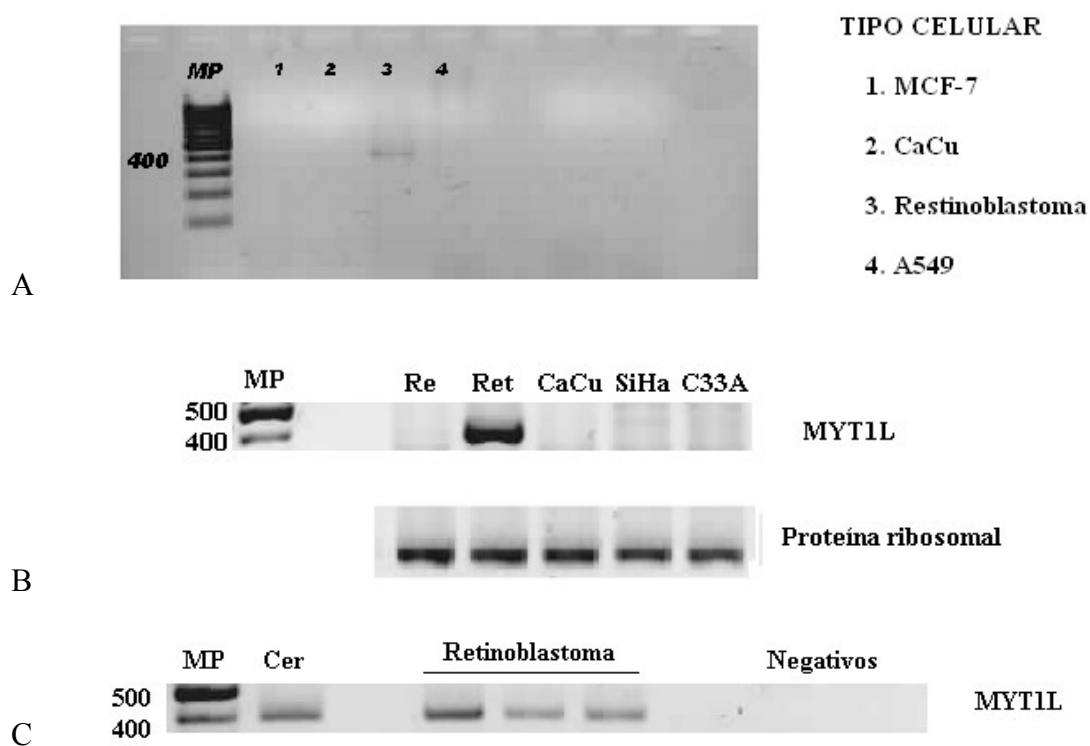


Figura 24. Expresión de MYT1L en diferentes líneas celulares tumorales: MCF7, CaCu, A549, SiHa, C33A y retinoblastoma (Ret) evaluada mediante RT-PCR. El mRNA de MYT1L se observó exclusivamente en muestras de mRNA provenientes de retinoblastoma.

7.5 Resumen de resultados

El VEGF inhibió la expresión de *eag1* en la línea celular de endotelio vascular HUVEC.

Las células dendríticas inmaduras diferenciadas a partir de monocitos expresan el mRNA y la proteína EAG1.

Las células dendríticas maduras (obtenidas en presencia de TNF α /PGE2 o LPS) expresan el mRNA y la proteína EAG1.

En células dendríticas inmaduras la localización de EAG1 es nuclear.

Durante un proceso de EMT en células A549 se observó un incremento en la expresión de EAG1 a nivel de mensajero y proteína.

El mRNA de MYT1L no está presente en varios tipos de células que expresan *eag1*.

Se encontraron diferentes niveles de expresión génica de MYT1L en diferentes muestras de retinoblastoma.

8

Discusión

8.1 Regulación de *eag1* por VEGF

Nuestros resultados sugieren que VEGF es un inhibidor endógeno de *eag1* en células endoteliales. En concordancia con lo obtenido en este trabajo, resultados recientes de nuestro laboratorio mostraron que el VEGF también disminuye la expresión del mensajero de *eag1* en células A549, también en una concentración de 5 ng/mL, aunque en un período de 24 h (Santos, 2009). Como se describió con anterioridad, células CHO y NH3T3 transfectadas con *eag1* secretan aproximadamente dos veces más VEGF que aquellas no transfectadas (Downie et al. 2008). Un efecto similar también ha sido reportado para otro miembro de la familia *eag*, el canal HERG, el cual también ha sido vinculado con procesos de proliferación de células tumorales (Masi et al. 2005). Se ha propuesto que EAG1 contribuye a un incremento en la expresión del factor inducido por hipoxia (HIF-1 α), el cual a su vez promueve la expresión de VEGF (Downie et al. 2008). De esta forma, EAG1 está incidiendo indirectamente en la expresión de VEGF. Con base en lo anterior, es posible que EAG1 esté vinculado en un circuito de retroalimentación negativa que controla la expresión de VEGF. Así, EAG1 incrementa la expresión de la citocina, y una vez ésta es liberada disminuye los niveles de expresión de EAG1. Queda por verificar si efectivamente en células endoteliales y A549 se incrementa la secreción de VEGF una vez se elevan los niveles de EAG1, y si existe tal circuito de retroalimentación.

Por otro lado, no se puede descartar la participación de EAG1 durante la apoptosis de células endoteliales. Un elevado número de células cultivadas en ausencia de suero se encontraron en suspensión, recordando el fenómeno de *anoikis*. Estas células presentaban un DNA fragmentado típico de células apoptóticas (Restrepo, 2006). Por otra parte es bien conocido que el VEGF es un factor de sobrevivencia de células endoteliales. Así, se puede sugerir que la expresión de EAG1 se incrementa en un ambiente apoptótico en células

endoteliales, y cuando éste es atenuado por la presencia de un factor de supervivencia como el VEGF, su expresión se reduce. Puesto que las células A549 fueron cultivadas en un medio definido (lo cual explica la ausencia de apoptosis) lo ocurrido en éstas apunta más a una regulación por parte de la citocina en este tipo celular.

8.2 Expresión de EAG1 en células dendríticas

Nuestros resultados confirman la presencia de EAG1 en DC cuando éstas son derivadas de células mononucleares de sangre periférica. Recientemente se han descrito un conjunto de canales iónicos en DC que incluye: canales de potasio dependientes de voltaje (Kv1.3 y 1.5), canales de potasio rectificadores entrantes, canales de sodio dependientes de voltaje (Nav 1.7) y canales de calcio no dependientes de voltaje (TRP's). Estos canales presentan una expresión dependiente del estado de la DC. Por ejemplo, se ha reportado que en DC inmaduras se observa una alta expresión y actividad de canales de potasio con características rectificadoras entrantes, la cual es reemplazada por las corrientes que fluyen por el Kv1.3 y Kv 1.5 en su estado de maduración (Mullen et al. 2006). Al igual que el rectificador entrante, el canal Nav 1.7 se expresa y es activo en DC inmaduras, sin embargo su expresión y actividad disminuyen a medida que las células alcanzan su estado maduro (Zsციros et al. 2009). Nuestros resultados indican que EAG1 también se expresa en el estado inmaduro de las DC, pero a diferencia de los otros canales dependientes de voltaje, éste parece tener un posible rol independiente de su función canónica como conductor de iones potasio en la membrana celular. Posiblemente su expresión en este estado de las DC se deba a una posible participación en el proceso de diferenciación de la célula. Se sabe que EAG1 incrementa su actividad en mioblastos momentos antes de su diferenciación (Occhiodoro et al. 1998). Recientemente se ha reportado que algunos canales de calcio del tipo TRP están involucrados en la diferenciación de las DC. Estos canales (TRPV-1) tienen un patrón de expresión similar al de EAG1, presentando los niveles más altos en las DC inmaduras y manteniendo ese nivel en las DC maduras (Thot et al. 2009).

EAG1 tiene una expresión exclusivamente nuclear en DC. Este es un resultado sorprendente porque EAG1 ha sido considerada por mucho tiempo una proteína de la

membrana celular. Sin embargo, resultados recientes utilizando anticuerpos que reconocen distintas regiones de la proteína, muestran que EAG1 está presente en la membrana nuclear interna de la línea celular de cáncer de mama MCF-7, y lo mismo ocurre en neuronas del cerebelo y del hipocampo. Aun se desconoce en qué proceso participa el canal en el núcleo de la célula; sin embargo, parece que en el compartimento nuclear éste conserva su función como conductor de iones potasio (Chen et al. 2011). No se conoce el proceso que lleva a EAG1 hacia la membrana nuclear, pero de acuerdo con observaciones realizadas en células CHO se puede plantear que el proceso puede depender de la glicosilación de la proteína. Se ha reportado que cuando EAG1 se encuentra glicosilado en el residuo de asparagina 406, que se encuentra cercano a la región poro, su localización está restringida a la membrana plasmática. Por otro lado, la ausencia de oligosacáridos complejos en este residuo o del residuo mismo, afecta su tráfico hacia la membrana y favorece una localización perinuclear (Napp et al. 2005). Se requieren más experimentos para definir si esta modificación postraduccional no ocurre en el canal que se expresa en DC y esto determina su localización.

8.3 Expresión de *eag1* en líneas tumorales de pulmón y durante EMT

Heag1 se expresa en las diferentes líneas celulares derivadas de cáncer de pulmón escamoso (de acuerdo con lo observado en la clínica [Hammerlein et al. 2008]), y en líneas celulares provenientes de adenocarcinomas de pulmón. Se necesitan estudios para determinar si en la clínica, *eag1* también se expresa en tumores pulmonares considerados como adenocarcinomas. La diferencia en la expresión de *eag1* tal vez se explica por la presencia de amplificaciones del gen o de la región que lo contiene en el cromosoma 1. En las bases de datos de *The Cancer Genome Project* (<http://www.sanger.ac.uk>; consultado 25/09/10) se puede encontrar que hay variaciones en el número de copias en la región cromosómica que contiene *eag1* en las líneas de cáncer de pulmón estudiadas. Por ejemplo, SK-LU-1 (que presenta el nivel de expresión más alto de *eag1*) tiene 4 copias de esta región, mientras A549 tiene 3 y A427 (que no presentó expresión de *eag1*) tiene 2 copias. Estudios cromosómicos son aun necesarios en las células 1.3.11 y 1.3.15 que presentaron

una muy baja, casi indetectable, expresión del mRNA del canal. Una amplificación de *eag1* ha sido reportada en muestras de cáncer de colon (Ousingsawat et al. 2007). Calu-1 y SK-MES-1 presentan 3 copias en la región donde se encuentra *eag1*, sin embargo su expresión es inferior a la observada en A549, sugiriendo que aunado a una posible amplificación, podrían existir alteraciones en la expresión de factores que modulan *eagly* que son específicos de cada célula. Es posible también que tal diferencia de expresión entre A549, CaLu-1 y SK-MES-1 se deba a una diferente vida media en el mRNA de *eag1* en estos tipos celulares.

La EMT ha sido propuesta como un proceso que conduce a la adquisición de un fenotipo maligno en células tumorales (Kalluri et al. 2009). En este trabajo se muestra que la expresión de EAG1 se incrementa en células A549 que están en EMT inducida por TGF- β 1. La EMT fue confirmada por la adquisición de una morfología fibroblastoide, una reducción en el nivel de mRNA de E-caderina, un aumento en la expresión de vimentina, y una mayor capacidad de migración en el ensayo *Scratch*. EAG1 ha sido sugerido como un marcador de diagnóstico y blanco terapéutico para diferentes tipos de cáncer (Hammerlein et al. 2008; Ousingsawat et al. 2007; Farias et al. 2004). Adicionalmente, varias observaciones permiten pensar que EAG1 está también involucrado en la malignidad de las células tumorales. La amplificación de *eag1* ha sido considerada como un marcador de pronóstico desfavorable en cáncer de colon (Ousingsawat et al. 2007). Una alta expresión de *eag1* ha sido encontrada en la línea de cáncer de colon T₈₄ de crecimiento rápido en comparación con las T₈₄, de crecimiento lento (Spitzner et al. 2008). Además, la expresión de *eag1* se ha encontrado en células invasivas de cáncer de mama (García-Becerra et al. 2010); la inhibición de EAG1 reduce la capacidad migratoria de células de leucemia (Agarwal et al. 2010) y la capacidad de metastatizar de células de cáncer de pulmón implantadas en ratón (Wulff et al. 2009). Se debe resaltar que la expresión de *eag1* es incrementada por factores que inducen EMT, como el factor de crecimiento similar a la insulina IGF-1 (Borowiec et al. 2007) y las oncoproteínas del virus del papiloma humano E6 y E7 (Díaz et al. 2009). Nuestros datos sugieren que, en lo que respecta al cáncer de

pulmón, el incremento de *eag1* forma parte de la adquisición de un fenotipo maligno, al menos en la línea A549.

El proceso de EMT inducido por TGF- β 1 es dependiente del ciclo celular. Por ejemplo, TGF- β 1 induce EMT en la línea celular AML-12 solo cuando éstas se encuentran en la fase G1/S, y proporciona las condiciones necesarias para que ocurra el proceso deteniendo las células en esta fase del ciclo celular (Yang et al. 2006, Song, 2007). De manera interesante, la actividad del EAG1 es regulada de forma dependiente del ciclo celular, siendo G1/S la etapa del ciclo donde se registran corrientes con la más alta magnitud (Pardo et al. 1998; Camacho et al. 2000; Ouaidid-Aidouch et al. 2004). Así, puede ser que TGF- β 1 al arrestar las células en G1/S favorezca la actividad de los factores que inducen la expresión de EAG1, y que el canal sea parte de las condiciones creadas por la citocina para inducir EMT. Es plausible pensar que la expresión de EAG1 durante la EMT inducida por TGF- β 1 es controlada por la vía de PI3K mediante su acción sobre la proteína p53. Borowiec et al. (2007) mostraron que la activación de esta vía de señalización conducía a un incremento en la expresión de EAG1 en células de cáncer de mama MCF-7. Por otro lado, también en lo que respecta a la regulación de la expresión génica de *eag1*, recientemente se reportó que p53 es un inhibidor de la expresión del canal en líneas celulares de neuroblastoma (Lin et al 2011). Es importante señalar que nuevos datos muestran que la actividad de p53 es importante para mantener un fenotipo epitelial y suprimir procesos de EMT (Schubert & Brabletz, 2011). Li et al. (2011) han propuesto que en la EMT de células A549 ocurre la degradación de p53 como consecuencia de la activación de PI3K/Akt. En este modelo, la actividad de Akt permite la fosforilación de ubiquitin-ligasa HDM2 o MDM2, promoviendo así su movimiento hacia el núcleo y favoreciendo la degradación de p53, lo cual permite la activación de genes orquestadores de la EMT. Así, con la pérdida de p53 se favorecería la expresión de *eag1* durante el proceso. Es de resaltar que se ha observado la activación de PI3K en procesos de EMT inducidos por TGF- β 1 en diferentes modelos que incluyen las células A549 (Larue & Bellacosa, 2005; Chen et al. 2011).

Se ha reportado que EAG1 incrementa la expresión del factor inducido por hipoxia, HIF-1 α , bajo condiciones de normoxia e hipoxia en células CHO (Downie et al. 2008). Por otra parte, se conoce que HIF-1 α es un promotor de EMT en células tumorales y no tumorales (Luo et al. 2006; Cannito et al. 2008; Sun et al. 2009). HIF-1 α induce la expresión de los factores de transcripción Twist y Snail, los cuales tienen roles determinantes durante la EMT (Klymkowsky et al. 2009). Ambos factores han sido considerados como marcadores de pronóstico desfavorable en cáncer de pulmón de células pequeñas (Hung et al. 2009). Snail inhibe la expresión de E-caderina, promueve la expresión de marcadores mesenquimales y metaloproteinasas e inhibe la proliferación. Por su parte, Twist también es un inhibidor de la expresión de E-caderina, promueve la expresión de fibronectina (marcador mesenquimal) y de N-caderina la cual está asociada con migración celular e invasión (Zeisberg & Nelson 2009; Yilmaz & Christofori, 2009). En adición, se conoce que HIF-1 α promueve la expresión de TGF- β 1 (López-Novoa & Nieto, 2009). Entonces, lo que proponemos es que TGF- β 1, mediante la vía de PI3K/Akt y la consecuente degradación de p53, incrementa la expresión de EAG1, lo cual favorece la expresión de HIF-1 α ; de esta manera se podría reforzar la expresión de factores de transcripción como Snail y Twist o del mismo TGF- β 1 conduciendo a la estabilidad del proceso de transición epitelial a mesenquimal. Se conoce que esta acción de EAG1 sobre la expresión de HIF-1 α es independiente de su papel canónico como conductor de iones potasio; así, la ausencia de efecto inhibitorio de la EMT por parte del astemizol no invalida un posible rol de EAG1 en este proceso.

Varias compañías farmacéuticas han empezado a desarrollar ensayos preclínicos y clínicos con nuevas moléculas que tienen como blancos farmacológicos muchos de los factores que aparecen regulando la EMT (Broxterman & Georgopapadaku, 2007). EAG1 podría ser una molécula con la cual trabajar a futuro en este aspecto a partir de los datos aquí presentados. Por otro lado, se ha considerado que algunas proteínas que inducen la EMT podrían servir como una aproximación válida en identificar nuevas moléculas cuya expresión esté asociada con un pronóstico adverso (Spaderma et al. 2006). Con respecto a

esto último, nuestro trabajo está en concordancia con las observaciones que muestran la expresión de EAG1 como un marcador de pronóstico desfavorable (Ousingsawat et al. 2007), y motiva la realización de futuros trabajos en esa dirección.

8.4 Regulación de la expresión de *eag1* por el factor de transcripción MYT1L

Con base en nuestros resultados se puede concluir que MYT1L no regula la expresión de *eag1*, por lo menos en las líneas celulares MCF-7, A549, CaCu, SiHa y C33A; esto sugiere que el factor de transcripción está poco asociado con los tumores que se expresan en la periferia. Se requieren experimentos donde se estudie la posible unión de MYT1L a la secuencia encontrada *in silico* próxima a la región 5' de *eag1* para descartar completamente la hipótesis de posible regulación génica.

MYT1L es un factor de transcripción que favorece la maduración de las células neuronales (Mukasa et al. 2004), por lo que su expresión diferencial en retinoblastomas puede reflejar una diferencia en el número de células aun diferenciadas que se encuentran en el interior del tumor. Esto sugiere que MYT1L puede ser un marcador del estado de retinoblastoma y su nivel de expresión podría ser útil en la clínica. Se deben analizar un mayor número de muestras para explorar esta posibilidad.

9

Conclusión

9.1 Conclusiones

- VEGF puede ser un regulador endógeno de *eag1*; cuya acción consistiría en una reducción de la expresión del canal.
- EAG1 puede formar parte de un circuito retroalimentador negativo que controla la secreción de VEGF.
- Al igual que en mioblastos, es posible que EAG1 esté involucrado en la diferenciación de las células dendríticas derivadas de monocitos CD14+.
- El incremento en la expresión de EAG1 durante el proceso de la EMT puede explicar por qué el incremento en la expresión de este canal se asocia con un fenotipo maligno.
- El papel de EAG1 como conductor de iones potasio no parece ser determinante en su hipotética función durante la EMT.
- La ausencia del mRNA de MYT1L sugiere que este factor de transcripción no está involucrado en la expresión de *eag1* en las líneas celulares A549 (cáncer de pulmón), C33A, CaCu y SiHa (cáncer de cérvix).
- La pérdida de MYT1L puede ser un indicador de grado para retinoblastoma.

9.2 Conclusión general

EAG1 parece participar en diversos procesos y componentes involucrados en el desarrollo tumoral, entre los que se encuentran el sistema inmune, el endotelio vascular, la proliferación y la adquisición de un fenotipo maligno. Esto puede explicar sus características como marcador tumoral, como blanco terapéutico, y como indicador de pronóstico.

10

Perspectivas

- **Determinar el papel de EAG1 en la biología de las células dendríticas.**
- **Determinar la función de EAG1 durante el proceso de EMT y en procesos asociados con malignidad, como la metástasis.**
- **Determinar si MYT1L puede servir como marcador de estadio tumoral en retinoblastomas.**

Bibliografía

Abbas AK, Lichtman AH, Pober J. 2002. Inmunología celular y molecular. 4ed. Mac Graw Hill.

Acloque H, Adams MH, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. 2009. Epithelia to mesenchymal transition: The importance to change state cell in development and disease. *J. Clin Invest.* 6: 1438-1449.

Agarwal JR, Griesinger F, Stuhmer W, Pardo LA. 2010. The potassium channel Ether a go-go is a novel prognostic factor with functional relevance in acute myeloid leukemia. *Mol. Cancer.* Doi:10.1186/1476-4598-9-18.

Ashcroft, FM. 2000. Ion Channels and Disease. 1^{ed}. Academic Press. USA.

Augustin H. 2005. Angiogenesis in the female reproductive system. *Experientia* 94: 35-52.

Bancherau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Jun-Yong L, Pulendran B, Palucka K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev. Immunol.* 18: 767-811.

Borowiec AS, Hague F, Guenin S, Guerineau F, Gouilleux F, Roudbaraki M, Lassoued K, Ouadid-Ahidouch H. 2007. IGF-1 activates hEAG K⁺ channels through an Akt-dependent signaling pathway in breast cancer cells: role in cell proliferation. *J. Cell. Physiol.* 212: 690-701.

Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, Schmalhofer O, Hiendlmeyer E, Jung A, Kirchner T. 2005. Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal epithelia transition, stem cells and beta-catenin. *Cells Tissues Organs.* 179:56-65

Broxterman HJ, Georgopapadakou NH. 2007. Anticancer therapeutics: a surge of new developments increasingly target tumor and stroma. *Drug Resist Updat.* 10:182-93.

Brüggemann A; Stühmer W, Pardo LA. 1997. Mitosis –promoting factor- mediated suppression of cloned delayed rectifier potassium channel expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 537-542.

Camacho J, Sánchez A, Stühmer W, Pardo L.A. 2000. Cytoskeletal interactions determine the electrophysiological properties of human EAG potassium channels. *Pflügers Arch.* 441: 167-174.

Camacho J. 2006. Ether à go-go potassium channels and cancer. *Cancer lett.* 233:1-9.

Cannito S, Novo E, Campagnone A, Valfré di Bonzo L, Busletta C, Zamara E, Paternostro C, Povero D, Bandino A, Bozzo F, Cravanzola C, Bravoco V, Colombatto S, Parola M. 2008. Redox mechanisms switch on hypoxia-dependent epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. *Carcinogenesis*. 29: 2267- 2278.

Carmeliet P. 2003. Angiogenesis in Health and Disease. *Nat. Med.* 9: 653-660.

Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M. 2005. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics*. 21:2933-42

Chen XF, Zhang HJ, Wang HB, Zhu J, Zhou WY, Zhang H, Zhao MC, Su JM, Gao W, Zhang L, Fei K, Zhang HT, Wang HY. 2011. [Transforming growth factor- \$\beta\$ 1 induces epithelial-to-mesenchymal transition in human lung cancer cells via PI3K/Akt and MEK/Erk1/2 signaling pathways.](#) *Mol Biol Rep*. DOI: 10.1007/s11033-011-1128-0.

Chen Y, Sánchez A, Rubio ME, Kohl T, Pardo LA, Stühmer W. 2011. Functional K(v)10.1 channels localize to the inner nuclear membrane. *PLoS One*. 6:e19257.

Coetzee A, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal M, Ozaita A, Putney D, Saganich M, Vega E, Rudy, B. 1999. Molecular Diversity of K⁺ Channels. *Ann. NY Acad. Sci.* 868: 233-276.

Cortinas C. 1997. Cáncer. Herencia y ambiente. Fondo de cultura económica. México DF, México.

Cross MJ, Claeson- Welsh L. 2001. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological response and therapeutic inhibition. *TRENDS pharmacol. Sci.* 22: 201-206.

Díaz L, Ceja-Ochoa I, Restrepo-Angulo I, Larrea F, Ávila-Chávez E, García-Becerra R, Borja-Cacho E, Barrera D, Ahumada E, Gariglio P, Álvarez-Ríos E, Ocadiz-Delgado R, García-Villa E, Hernández-Gallegos E, Camacho-Arroyo I, Morales A, Ordaz-Rosado D, García-Latorre E, Escamilla J, Sánchez-Peña LC, Saqui-Salces M, Gamboa-Domínguez A, Vera E, Uribe-Ramírez M, Murbartián J, Ortiz CS, Rivera-Guevara C, De Vizcaya-Ruiz A, Camacho J. 2009. Estrogen and human pillomavirus oncogenes regulate human ether-à-go-go-1 potassium channel expression. *Cancer Res*. 8:3300-3307.

Downie BR, Sánchez A, Knötgen H, Contreras-Jurado C, Gymnopoulos M, Weber C, Stühmer W, Pardo LA. 2008. Eag1 expression interferes with hypoxia homeostasis and induces angiogenesis in tumors. *J. Biol. Chem.* 283: 36234-40.

Fariás L, Bermudez O, Larrea F, Ávila-Chávez E, Cadena A, Hinojosa L, Lara G, Villanueva L, Vargas C, Hernández-Gallegos E, Camacho-Arroyo I, Dueñas-González A, Pérez-Cardenas E, Pardo L Morales, A, Taja-Chayeb L, Escamilla J, Sánchez-Peña J, Camacho J. 2004. Ether á go-go Potassium Channels as Human Markers. *Cancer Res.* 64: 6996-7001.

Folkman J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285: 1132

Folkman J. 2007. Angiogenesis: An organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov.* 6:273.

García-Becerra R, Díaz L, Camacho J, Barrera D, Ordaz-Rosado D, Morales A, Ortiz CS, Avila E, Bargallo E, Arrecillas M, Halhali A, Larrea F. 2010. Calcitriol inhibits Ether-a-go-go potassium channel expression and cell proliferation in human breast cancer cells. *Exp Cell Res.* 316: 433-42.

Gavrilova-Ruch O, Schönherr, K, Gessner G, Schönherr, R, Klapperstück, T, Wohlrab, W, Heinemann SH. 2002. Effects of imipramine on ion channels and proliferation of IGR1 melanoma cells. *J. Membrane Biol.* 188: 137-149.

Grgic I, Eichler I, Heinau P, Si, H, Brakemeier S, Hoyer J, Köhler R. 2004. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25: 704-709.

Hemmerlein B, Weseloh RM, De Queiroz FM, Knötgen H, Sánchez A, Rubio ME, Martin S, Schliephacke T, Jenke M, Heinz- JR, Sthümer W, Pardo L. 2006. Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumors. *Mol. Cancer.* 5:41.

Hung JJ, Yang MH, Hsu HS, Hsu WH, Liu JS, Wu KJ. 2009. Prognostic significance of hypoxia-inducible factor-1alpha, TWIST1 and Snail expression in resectable non-small cell lung cancer. *Thorax.* 64: 1082-1089.

Ikenouchi J, Matsuda M, Furuse M, Tsukita S. 2003. Regulation of tight junctions during the epithelial-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by snail. *J. Cell Sci.* 116:1959- 1967.

Jain RK. 2005. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in angiogenic therapy. *Science.* 307:58.

Kalluri R. 2009. EMT: When epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J.Clin. Invest.* 119:1417-1419.

Kandel E, Schwartz J, Jessell T. 2000. Principles of Neural Sciences. 4ed. Mac- Graw Hill. New York

Kasai H, Allen JT, Mason RM, Kimimura T, Zhang Z. 2005. TGF- β 1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir Res*. Doi: 10.1186/1465-9921-6-56..

Kim JH, Jang YS, Eom KS, Hwang YI, Kang HR, Jang SH, Kim CH, Park YB, Lee MG, Hyun IG, Jung KS, Kim DG. 2007. Transforming growth factor β 1 induces epithelial-to-mesenchymal transition of A549 cells. *J. Korean Med Sci*. 22:898-904.

Kim JG, Armstrong RC, v Agoston D, Robinsky A, Wiese C, Nagle J, Hudson LD. 1997. Myelin transcription factor 1 (Myt1) of the oligodendrocyte lineage, along with a closely related CCHC zinc finger, is expressed in developing neurons in the mammalian central nervous system. *J Neurosci Res*. 50:272-90.

Klymkowsky M.W, Savagner P. 2009. Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *Am. J. Pathol*. 174:1588-1593.

Kokkinos MI, Wafai R, Wong MK, Newgren DF, Thompson EW, Waltham M. 2007. Vimentin and epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer-observations in vitro and in vivo. *Cell tissues Organs*. 185:191-203.

Larue L, Bellacosa A. 2005. [Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways](#). *Oncogene*. 25:7443-7454

Li LP, Lu CH, Chen ZP, Ge F, Wang T, Wang W, Xiao CL, Yin XF, Liu L, He JX, He QY. 2011. [Subcellular proteomics revealed the epithelial-mesenchymal transition phenotype in lung cancer](#). *Proteomics*. 11: 429-439.

Lin H, Li Z, Chen C, Luo X, Xiao J, Dong D, Lu Y, Yang B, Wang Z. 2011. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms for oncogenic overexpression of ether α go-go K⁺ channel. *PLoS One*. 6:e20362.

Liang CC, Park AY, Guan JL. 2008. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis cell migration. *Nat. Prot*. 2:329-333.

Logullo AF, Nonogaki S, Pasini FS, Osorio CA, Soares FA, Brentani MM. 2010. Concomitant expression of epithelial-mesenchymal transition biomarkers in breast ductal carcinoma: association with progression. *Oncol Rep*. 23: 313-320.

López-Novoa JM, Nieto MA. 2009. Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO Mol. Med*. 1:303-314.

Ludwig J, Terlau H, Wunder F, Brüggemann A, Pardo L, Marquardt A; Stühmer W, Pongs O. 1994. functional expression of a rat homologue of the voltage gated ether a go-go potassium channel reveals difference in selectivity and activation kinetics between the *Drosophila* and its mammals counterpart. *EMBO J.* 13 : 4451-4458.

Ludwig J, Weseloh R, Karschin C, Liu Q, Netzer R, Engeland B, Stansfeld C, Pongs O. 2000. Cloning and functional expression of rat eag2, a new member of the ether-a-go-go family of potassium channels and comparison of its distribution with that of eag1. *Mol. Cell. Neurosci.* 16 : 59-70.

Luo Y, He DL, Ning L, Shen SL, Li L, Li X. 2006. Hypoxia-inducible factor-1alpha induces the epithelial-mesenchymal transition of human prostatecancer cells. *Chin Med. J (Engl).* 199: 713-718.

Lutze MT, Jaffe R. 1993. **Cancer.** En : Dendritic cells. Lutz MT, Thompson AW ed Academic Press. USA

Macias, RY. 2005. Expresión del mRNA del canal de K⁺ EAG en la placenta de rata en desarrollo. Tesis de maestría. Depto de Farmacología, CINVESTAV-IP.

Marble DD, Hegle A.P, Snyder E, Dimitratos S, Brayant P.J, Wilson GF. 2005. Camguk/CASK enhances ether-a-go-go potassium current by a phosphosrylation-dependent mechanism. *J. Neurosci.* 25 : 4898-4907.

Masi A, Becchetti A, Restano-Cassulini R, Polvani S, Hofmann G, Buccoliero A. M, Paglierani M, Pollo, B, Taddei, GL, Gallina P, Di Lorenzo N, Franceschetti S, Wanke, E, and Arcangeli, A. 2005. hERG1 channels are overexpressed in glioblastoma multiforme and modulate VEGF secretion in glioblastoma cell lines. *Br. J. Cancer* 93. 781–792.

Mello de Queiroz F, Suarez-Kurtz G, Stühmer, W, Pardo, L . 2006. Ether a go-go potassium channel expression in soft tissue sarcoma patients. *Mol Cancer.* 5: 42.

Mercado-Pimentel ME, Runyan RB. 2007. Multiple transforming growth factor-beta isoforms and receptors function during epithelial to mesenchymal cell transformation in the embryonic heart. *Cell Tissues Organs.* 185: 146-56.

Meyer, R, Heinemann, S. 1998. Characterization of an EAG-like potassium channel in human neuroblastoma cells. *J. Physiol.* 508: 49-56.

Meyer, R, Schönherr, R, Gavrilova-Ruch O, Wohlrab, W, Heinemann S.H. 1999. Identification of ether a go-go and calcium activated potassium channels in human melanoma cells. *J. Membr. Biol.* 171 : 107-115.

Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. 2010. Epithelial-mesenchymal transition in cancer : Parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland. Biol. Neoplasia* 15 : 117-134

Minn AJ, Massagué J. 2009. Invasion and metastasis. En : Cancer : principles and practice of oncology. [Vincent T. DeVita](#), [Theodore S. Lawrence](#), [Steven A. Rosenberg](#), [Robert A. Weinberg](#), [Ronald A. DePinho](#) Ed. Lippincott Williams & Wilkins. USA.

Mukasa A, Ueki K, Ge X, Ishikawa S, Ide T, Fujimaki T, Nishikawa R, Asai A, Kirino T, Aburatani H. 2004. [Selective expression of a subset of neuronal genes in oligodendroglioma with chromosome 1p loss.](#) *Brain Pathol.* 14:34-42

Mullen, K, Rozycka, M, Rus, H, Hu, L, Cudrici, C, Zafranskaia, E, Pennington, M.W, Johns, D, Judge, S, Clabrasi, P. 2006. Potassium channels Kv 1.3 and Kv 1.5 are expressed on blood-derived dendritic cells in the central nervous system. *Ann. Neurol.* 60:118-127.

Napp J, Monje F, Stühmer W, Pardo L.A. 2005. Glycosylation of eag1 (Kv 10.1) potassium channels. *J. Biol. Chem.* 280: 29506-29512.

Nyberg P, Salo T, Kalluri R. 2008. Tumor microenvironment and angiogenesis. *Front. Biosci.* 13: 6537-6553.

Occhiodoro T, Bernheim L, Jian-Hui L, Bijlenga P, Sinnreich M, Bader Ch, Fischer-Lougheed J. 1998. Cloning of a human ether-a-go-go potassium channel expressed in myoblast at the onset of fusion. *FEBS Lett.* 434: 177-182.

Ouadid-Ahidouch H, Roudbaraki M, Delcourt P, Ahidouch A, Joury N, Prevarskaya N. 2004. functional and molecular identification of intermediate-conductance Ca²⁺-activate potassium channels in breast cancer cells: Association with cell cycle progression. *Am. J. Cell Physiol.* 287: C125-C134.

Ousingsawat J, Spitzner M, Puntheeranurak S, Terraciano L, Tornillo L, Bubendorf L, Kunzelmann K, Schreiber R. 2007. Expression of voltage-gated potassium channels in human and mouse colonic carcinoma. *Clin Cancer Res*, 13:824-831.

Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, Wang HR, Zhang Y, Wrana JL. 2005. regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science.* 307:1603-1609.

Pardo LA, Brüggemann A, Camacho J, Stühmer W. 1998. Cell cycle-related changes in the conducting properties of r-eag K⁺ channels. *J. Cell. Biol.* 143:767-775.

Pardo LA, Del Camino D, Sánchez A, Alves F, Brüggemann, A, Beckh S, Stühmer, W. 1999. Oncogenic potential of EAG K(+) channels. *EMBO J.* 18: 5540-5547.

Parker N, Siemann D. 2011. Establishing the tumor microenvironment. En: tumor microenvironment. Ed. Siemann D. Jhon Willey & Sons.

Perl AK, Wilgenbaus P, Dahl U, Semb H, Christofori G. 1998. A causal role of E-cadherin in the transition of adenoma to carcinoma. *Nature.* 392: 190-193.

Piros E.T, Shen L, Huang X. Y. 1999. Purification of an EH domain-binding protein from rat brain that modulates the gating of the rat ether-a-go-go channel. *J.Biol. Chem.* 274: 33677-33689.

Pollard, T. D & Earnshaw, W.C. 2000. Cell Biology. Saunders eds. New york

Prasad CP, Rath G, Mathur S, Bhatnagar D, Parshad R, Ralhan R. 2009. Expression analysis of E-cadherin, Slug, GSK3beta in invasive ductal carcinoma of breast. *BMC cancer.* 9:325.

Restrepo I. 2006. Regulación del canal de potasio EAG1 humano por estrógenos y VEGF. Tesis de maestría. Depto de Farmacología, CINVESTAV-IP.

Ronnov-Jenssen L, Peterssen O.W, Bissell MJ. 1996. Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: Importance of stromal reaction. *Physiol. Rev.* 76:69-125.

Ruddon R.W. 2007. Cancer biology. 4th ed. Oxford University Press. New York, US

Saganich MJ, Vega-Saenz de Miera E, Nadal M.S, Baker H, Coetzee A, Rudy B. 1999. Cloning of components of a novel subthreshold-activating K⁺ channel with a unique pattern of expression in the cerebral cortex. *J. Neurosci.* 19:10789-10802.

Santos N. 2009. Efectos de los factores de crecimiento sobre la expresión del mRNA del canal oncogénico hEag1 en células cancerosas. Tesis de maestría. Depto de Farmacología, CINVESTAV-IP.

Song J. 2007. EMT or apoptosis: a decision for TGF- β . *Cell Res.* 17: 289-290.

Shönherr R, Lober K, Heinemann S. 2000. Inhibition of human ether á go-go potassium channels by Ca⁺⁺/Calmodulin. *EMBO J.* 19: 3263-3271.

Schubert J, Brabletz T. 2011. p53 Spreads out further: suppression of EMT and stemness by activating miR-200c expression. *Cell Res.* 21(5):705-7.

Spaderna S, Schmalhofer O, Hlubek F, Berx G, Eger A, Merkel S, Jung A, Kirchner T, Brabletz T. 2006. A transient, EMT-linked loss of basement membranes indicates metastasis and poor survival in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 131: 830-40.

Spitzner, M, Ousingsawat, J, Scheidt, K, Kunzelmann, K, Schreiber, R. 2007. Voltage-gated K⁺ channels support proliferation of colonic carcinoma cells. *FASEB J*. 21:35-44.

Spitzner M, Martn JR, Soria RB, Ousingsawat J, Scheidt K, Schreiber R, Kunzelman K. 2008. Eag1 and Bestrophin 1 are up-regulated in fast-growing colonic cancer cells. *J. Biol. Chem.* 283: 7421- 7428.

Sun X, Hodge J, Zhou Y, Nguyen M, Griffith L. 2004. The eag potassium channel binds and locally activates calcium/ calmodulin- dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem.* 279: 10206-10214.

Sun S, Ning X, Zhang Y, Lu Y, Nie Y, Han S, Liu L, Du R, Xia L, He L, Fan D. 2009. Hypoxia-inducible factor-1 α induces Twist expression in tubular epithelial cells subjected to hypoxia, leading to epithelial-to-mesenchymal transition. *Kidney Int.* 75: 1278-1287.

Tiwari M. 2010. From tumor immunology to cancer immunotherapy: miles to go. *J. Can Res. Ther.* 6: 427-431.

Tsly TD, Hein PW. 2001. Known the neighbor: Stromal cell can contribute oncogenic signals. *Current opinion in genetics and development.* 11: 54-59.

Xiu Xia Sun, S. Lynn Bostrom, Leslie C. Griffith. 2009. Alternative splicing of the *eag* potassium channel gene in *Drosophila* generates a novel signal transduction scaffolding protein. *Mol. Cell. Neurosci.* 40: 338-43.

Terlau H, Ludwig J, Steffan R, Pongs O, Sthümer W, Heinemann S. 1996. Extracellular Mg⁺² regulates activation of rat EAG potassium channel. *Pflügers Arch.* 432: 301-312.

Toth BL, Benko S, Szollosi A, Kovacs L, Rajnavolgyi E, Biro, T. 2009. Transient receptor potential vanilloid-1 signaling inhibits differentiation and activation of human dendritic cells. *FEBS letters.* 583:1619-1624.

Trimboli AJ, Fukino K, de Bruin A, Shen W, Tanner SM. 2008. Direct evidence for epithelial to mesenchymal transitions in breast cancer. *Cancer Res.* 68: 937-45.

Vergara D, Merlot B, Lucot JP, Collinet P, Vinatier D, Fournier I. 2010. epithelial to mesenchymal transition in ovarion cancer. *Cancer Lett.* 291:59-66.

- Visser KE, Eichten A, Coussens LM.** 2006. Paradoxical role of the immune system during cancer development. *Nature*, 6: 24-37.
- Wang Z, Wilson GF, Griffith L.C.** 2002. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylates and regulates the Drosophila eag potassium channel. *J. Biol Chem.* 277: 24022-24029.
- Warmke JM, Ganetzky B.** 1994. A family of potassium channels genes related to eag in Drosophila and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:3438 – 3442.
- Weber, C, Queiroz, F.M, Downie, B.R, Suckow, A, Sthümer, W, Pardo, L.** 2006. Silencing the activity and proliferative properties of the human Eag1 potassium channels by RNA interference. *J.Biol. Chem.* 281:13030-13037.
- Wulff H, Castle NA, Pardo L.A.** 2009. Voltage gated potassium channels as a therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 8: 982-1001.
- Yang AD, Bauer TW, Camp ER.** 2005. Improving delivery antineoplastic agents with anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Cancer*, 103: 1561.
- Yang Y, Pan X, Lei W, Wang J, Song J.** 2006. Transforming growth factor beta 1 induces epithelial- to- mesenchymal transition and apoptosis via a cell cycle-dependent mechanism. *Oncogene.* 25: 7235-7244.
- Yilmaz M, Christofori G.** 2009. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 28: 15-33.
- Zachary I.** 2005. Signal transduction in angiogenesis. *Experientia* 94: 267-300.
- Zsiros E, Kis-Toth K, Hajdu P, Gaspar R, Bielanska J, Felipe A, Rajnavolgyi E, Panyi G.** 2009. Developmental switch of the expression of ion channels in human dendritic cells. *J. Immunol.* 183: 4483-92.
- Zeisberg M, Nelson E.G.** 2009. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J. Clin. Invest.* 199: 1429-1437.
- Ziechner U, Shonherr R, Born A, K, Gavrilova- Ruch O, Glaser A.W, Malesevic M, Kullertz G, Heinemann S.** 2006. Inhibition of human ether a go-go potassium channels by Ca²⁺/calmodulin binding to the cytosolic N- and C-termini. *FEBS J.* 273: 1074-1086.

