



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE
ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO**

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Expresión de los canales tipo-T y Eag1 en líneas celulares
de próstata y el efecto del astemizol sobre la proliferación y la
apoptosis”**

Tesis que presenta

M. en C. Gloria Alejandra Bernal Ramos

Para Obtener el Grado de

Doctor en Ciencias

En la Especialidad en

Genética y Biología Molecular

Directores de Tesis

Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo

Dr. J. Efraín Garrido Guerrero

Ciudad de México

Septiembre, 2018

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer al Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo por aceptarme como parte de su laboratorio y confiar en mí para realizar este proyecto; así como por todo el conocimiento que obtuve durante mi estancia en su laboratorio.

Al Dr. Efraín Garrido Guerrero por participar en mi formación, por su apoyo incondicional, consejos y confianza, por estar siempre al pendiente de mis avances; lo que llevó a que este proyecto llegara hasta el final.

Al Dr. Bulmaro Cisneros Vega por sus comentarios y por sus asesorías que permitieron enriquecer y mejorar este proyecto.

Al Dr. Javier Hernández Sánchez por su apoyo, comentarios y asesorías durante mi estancia en el Doctorado.

A la Dra. Yesennia Sánchez Pérez y al Dr. Euclides Ávila Chávez quiero hacer un agradecimiento especial por su apoyo incondicional. Gracias por estar siempre al pendiente de mí y del proyecto, por sus conocimientos, consejos y comentarios que me enriquecieron como persona, investigadora en formación y que mejoraron este proyecto en cada momento; por su amistad y por nunca dejar que me rindiera. Gracias por su tiempo, por apoyarme siempre y en cada momento; porque sin su apoyo este proyecto no hubiera llegado a su término.

A la Química Elizabeth Hernández por sus enseñanzas, atenciones, consejos, ayuda y apoyo incondicional.

A la Química Eunice Vera por sus enseñanzas, ayuda, apoyo incondicional y por todo lo que me aportó durante el desarrollo de este proyecto.

Al Biólogo Pedro Chávez Olmos por su amistad, por todos sus consejos, por sus asesorías, por su ayuda y apoyo incondicional.

A mis compañeras del laboratorio 13 de Farmacología y del laboratorio 1 de Genética por su amistad, apoyo, enseñanza y consejos durante mi estancia en el Doctorado.

A mi amiga la Dra. Griselda Vélez por su amistad, por compartir sus conocimientos.

A Gabriela Mora por estar siempre al pendiente de todos los trámites administrativos.

A Victor Hugo Rosales por su ayuda en el manejo y uso del citómetro.

DEDICATORIAS

Son muchas las personas especiales a las que me gustaría agradecer su amistad, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida, algunas están aquí conmigo y otras en mi recuerdos y en el corazón, y sin importar donde estén o si alguna vez llegan a leer estas dedicatorias quiero darles las gracias por formar parte de mi vida, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones; gracias por ayudarme cada día a cruzar con firmeza el camino de la superación, porque con su apoyo y aliento hoy he logrado uno de mis más grandes anhelos.

A mi Mamá Blanca Lilia Ramos Rojas que es para mí una inspiración, así como un ejemplo a seguir gracias por todos tus sacrificios que me permitieron salir adelante, por tus enseñanzas, por tu apoyo incondicional, por tus bendiciones y con este triunfo quiero demostrarte que no todo ha sido en vano que he logrado crecer en todos los aspectos y que sin ti este sueño no sería realidad te amo mamá.

A mis dos papás José de Jesús Bernal Camacho que aunque ya no estás conmigo sé que siempre me cuidaste y me guiaste desde donde estas y a Jorge Luna Olivares gracias por tus enseñanzas, cuidados y por formar parte de mi vida.

A mi Tía Martha Alicia Ramos Rojas por ser una segunda madre para mí, por tu apoyo y ayuda incondicional, por tus consejos, cuidados y enseñanzas, que me ayudaron a ser una mejor persona y a cumplir todos mis sueños; sabes que te quiero mucho y sin ti al igual que sin mi mama este triunfo no sería una realidad.

A mis hermanas Jazmín Bernal Ramos y Blanca Lilia Luna Ramos gracias por formar parte de mi vida por su apoyo y ayuda incondicional en los momentos más difíciles de mi vida, por su amistad, compañía y consejos sin ustedes este triunfo no se hubiera logrado las amo mucho.

A mi sobrino Ángel Arturo gracias por formar parte de mi vida, por llenarme de alegría y amor.

A mis amigas del CINVESTAV Griselda (maestra), Diana, Alma, Ana, Aurora e Isa a mis amigas de Ecuador Katy, Andrea, Caro, Spoky, Alejandra gracias por su amistad, por su apoyo, consejos y por todos esos momentos en el CINVESTAV de alegría, fiestas y estudios que me permitieron concluir con mi Doctorado las quiero mucho.

A la Dra. Yesennia Sánchez Pérez y al Dr. Euclides Ávila Chávez porque sin su apoyo incondicional y consejos en cada etapa del doctorado esta tesis no hubiera sido posible; por no permitir que me rindiera nunca.

Al amor de mi vida mi esposo Eduardo Zavala Olvera gracias por tu ayuda y apoyo incondicional, por tus consejos, por creer en mí, por llenar mi vida de alegría, por estar siempre a mi lado, por ser mi inspiración y por compartir los momentos más importantes de mi vida.

A mis hijos Leonel y Maya Quetzalli Zavala Olvera por venir a darle un giro completo a mi vida, por llenarme de alegría y fuerza para continuar este camino, por ser un motivo de inspiración para superarme y ser mejor persona en todos los aspectos, gracias por iluminar mi camino los amo.

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Oncofarmacología Molecular (Lab. No. 13) del Departamento de Farmacología del CINVESTAV-IPN y en el laboratorio de Biología Molecular y Celular del Cáncer (Lab. No. 1) del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN; contando con la dirección del Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo y el Dr. José Efraín Garrido Guerrero. Durante la realización de este trabajo conté con una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número de becario: 243149.

Este trabajo fue financiado con fondos provenientes del CONACYT del proyecto CB256514 (JEGG).

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIAS.....	iii
FINANCIAMIENTO.....	v
ÍNDICE GENERAL.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	viii
ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUCCIÓN.....	14
1.1. El cáncer de próstata.....	14
1.1.1. Características del cáncer de próstata.....	14
1.1.2. Factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de próstata.....	18
1.1.3. Métodos de diagnóstico y detección del cáncer de próstata.....	21
1.2. Canales iónicos en cáncer.....	22
1.2.1. Canales de calcio.....	24
1.2.1.1. Características y función de los canales de calcio.....	26
1.2.1.2. Canales de calcio dependientes de voltaje (VDCCs).....	28
1.2.1.3. Características de los canales de calcio dependientes de voltaje VDCC.....	29
1.2.1.4. Características de los canales de calcio tipo-T.....	33
1.2.1.5. Canales de calcio tipo-T en cáncer.....	35
1.2.1.6. Canales de calcio tipo-T en cáncer de próstata.....	37
1.2.2. Canales de potasio.....	39
1.2.2.1. Características y función de los canales de potasio.....	39
1.2.2.2. Características del canal de potasio Eag1.....	40
1.2.2.3. El canal de potasio Eag1 en cáncer.....	43
1.2.2.4. El canal de potasio Eag1 en cáncer de próstata.....	48
2. JUSTIFICACIÓN.....	50
3. HIPÓTESIS.....	50
4. OBJETIVOS.....	51
4.1. Objetivo General.....	51
4.2. Objetivos Particulares.....	51

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	52
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
6.1. Materiales.....	53
6.2. Líneas celulares.....	53
6.3. Expresión génica.....	54
6.4. Inmunofluorescencia	54
6.5. Patch Clamp.....	55
6.6. Inmunocitoquímica.....	57
6.7. Tasa de proliferación.....	58
6.8. Ensayo de Proliferación.....	58
6.9. Apoptosis.....	58
6.10. Análisis estadístico.....	59
7. RESULTADOS.....	60
7.1. Análisis de la expresión de los canales de calcio tipo-T en líneas de próstata.....	61
7.2. Determinación de la actividad de los canales de calcio tipo-T en las líneas RWPE1 y WPE1-NB26.....	65
7.3. Análisis de la expresión del canal Eag1 en líneas de próstata.....	68
7.4. Proliferación celular de las líneas de próstata.....	70
7.5. Análisis del efecto del astemizol sobre la proliferación en líneas de próstata.....	71
7.6. Inducción de la apoptosis con astemizol en la línea WPE-NB26.....	73
8. DISCUSIÓN.....	75
9. CONCLUSIONES.....	84
10. PERSPECTIVAS.....	85
11. BIBLIOGRAFÍA.....	86

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Fig. 1.- Progresión del cáncer de próstata.....	16
Fig. 2.- Papel de las células neuroendocrinas en cáncer de próstata.....	17
Fig.3.- Perfil y papel de los canales iónicos en cáncer (próstata, páncreas, pulmón, esófago, mama, gástrico y colon).....	23
Fig. 4.- Función y tipos de canales de Ca^{2+}	25
Fig.5.- Representación esquemática de la estructura de los canales VDCCs.....	32
Fig. 6.- Representación esquemática de Eag1.....	42
Fig. 7.- Expresión de Eag1.....	44
Fig. 8.- Líneas celulares de próstata.....	61
Fig. 9.- Niveles de RNAm de los canales de calcio tipo-T detectados en las líneas de próstata.....	63
Fig. 10.- Detección mediante Inmunofluorescencia (IF) de las proteínas Cav3.1 y Cav3.2 en líneas derivadas de próstata.....	64
Fig. 11.- Patch-clamp de canales tipo-T en las líneas celulares derivadas de próstata y HEK 3.3.....	67
Fig. 12.- Niveles de RNAm y detección de proteína del canal Eag1 en las líneas derivadas de próstata.....	69
Fig. 13.- Proliferación celular en las líneas de próstata.....	71
Fig. 14.- Efecto anti-proliferativo del astemizol en líneas de próstata.....	73
Fig. 15.- Inducción de la apoptosis con astemizol en la línea WPE-NB26.....	74
Tabla 1. Composición de soluciones internas y externas usadas en el ensayo patch-clamp.....	56

ABREVIATURAS

CP	cáncer de próstata
NE	células neuroendocrinas
NED	diferenciación de células neuroendocrinas
AR	receptor de andrógenos
SNPs	polimorfismos de un solo nucleótido
PAP	fosfatasa ácida prostática
VEGF	factor de crecimiento vascular
PSA	antígeno prostático específico
PIN	neoplasia intraepitelial
CAM	calmodulina
MPF	factor promotor de mitosis
HIF-1	factor inducible de hipoxia1
HCC	hepatocarcinoma celular
HVA	activados por alto voltaje
LVA	activados por bajo voltaje
DHP	dihidroxipirimidinas
PAAs	fenilalcalinaminas
BTZ	benzodiazepinas
PTX	proteína tirosina cinasa
PKC	proteína cinasa C
PI	ioduro de propideo
VDR	receptor a vitamina D
DHEA	dihidroepiandrosterona
TRUS	ultrasonido transrectal

RESUMEN

El cáncer de próstata (CP) es la segunda causa de mortalidad en hombres. En los últimos años ha ocurrido un incremento importante en su incidencia y mortalidad ganando relevancia a nivel mundial, haciendo necesario encontrar nuevos tratamientos. Es por ello que investigaciones recientes se han enfocado en estudiar nuevos blancos moleculares, que permitan disminuir su agresividad y tener tratamientos más eficaces. Recientemente se ha propuesto a los canales iónicos como posibles blancos terapéuticos, ya que se ha demostrado su participación en el desarrollo de diferentes tipos de cánceres, regulando diversos aspectos del comportamiento del tumor, como la proliferación celular, la apoptosis, la migración y la invasión. Entre los canales que se han demostrado estar involucrados, se encuentran los canales de calcio dependientes de voltaje (VDCCs) Cav3.1 y Cav3.2 y el canal de potasio *Eter à-go-go-1* (Eag1).

Se ha reportado que un aumento en la expresión del canal Cav3.2 favorece el desarrollo tumoral, activando la proliferación celular e inhibiendo la apoptosis, actuando como un posible oncogen; mientras que la pérdida o silenciamiento del canal Cav3.1 genera células aberrantes favoreciendo la progresión tumoral; por lo que se le ha propuesto como un posible supresor de tumor. En cuanto al canal de potasio Eag1, se ha determinado que su expresión es limitada en tejido normal mientras que en tejido tumoral se expresa de manera abundante en diferentes tipos de tejidos, favoreciendo el desarrollo tumoral. El tratamiento con el astemizol, un fármaco que bloquea el canal Eag1 ha demostrado tener un efecto importante en inhibir el desarrollo tumoral, ya que el tratamiento con este fármaco genera una disminución de la proliferación celular y la formación de tumores en un modelo de ratones inyectados con células que expresan éste canal; por lo que se ha sugerido a Eag1 como posible blanco terapéutico.

En este proyecto estudiamos en células derivadas de tejido prostático la expresión de RNAm y de proteína de los canales Cav3.1, Cav3.2 y Eag1; así como el efecto del astemizol sobre la proliferación y apoptosis debido al bloqueo de Eag1. El modelo celular usado está formado por cuatro líneas celulares con características diferentes: RWPE1

(no invasiva), WPE-NB22 (poco invasiva), WPE-NB14 (medianamente invasiva) y WPE-NB26 (muy invasiva); las cuales asemejan todas las etapas de desarrollo del CP. Los niveles de mRNA de los canales fueron evaluados mediante RT-PCR cuantitativa, y los niveles proteicos por inmunofluorescencia e inmunohistoquímica. Los ensayos de curva de crecimiento, proliferación y apoptosis fueron realizados mediante el las técnicas de Azul Alamar, MTT y citometría de flujo.

El análisis de expresión de los canales Cav3.1 y Cav3.2 mostró que no existen diferencias significativas en las líneas celulares integrantes de nuestro modelo de estudio. Interesantemente, mediante ensayos de Patch clamp, no fue posible detectar actividad de estos canales en estas células, lo que permite deducir que debido a la naturaleza del modelo celular, estos canales no se encuentran involucrados en el fenotipo canceroso e invasivo de este modelo celular.

En el caso del canal Eag1, se encontró que no existen diferencias significativas en sus niveles de RNAm entre la líneas RWPE1 y WPE-NB26; sin embargo, se encontró que existían diferencias importantes tanto en el nivel de la proteína, como en su localización sub-celular, observándose de manera más abundante la proteína Eag1 en la línea WPE-NB26 (la más invasiva del modelo) en comparación con la línea RWPE1, teniendo además una localización no únicamente citoplasmática como en RWPE1, sino también nuclear, sugiriendo la posible participación de esta proteína en la regulación de genes.

El tratamiento de estas líneas celulares con concentraciones nanomolares de astemizol, provocó una disminución significativa en la proliferación y un incremento en la apoptosis, únicamente en línea WPE-NB26 que expresa de manera importante el canal Eag1. Esto resultados sugieren que Eag1 podría estar involucrado en el desarrollo del CP y que el astemizol, un fármaco que bloquea el canal, debe ser considerado para el tratamiento de CP en pacientes con altos niveles de esta proteína, después de realizarse los ensayos necesarios para su validación y aprobación.

ABSTRACT

Prostate Cancer (PC) is the second cause of death in man. In the recent years, an important increase in the incidence and mortality has been observed, gaining relevance worldwide and making necessary to find new therapies. Then, recent research has been focused on the study of new molecular targets that allow to diminish the aggressiveness of the disease and more efficient treatments. Recently, the ionic channels have been proposed as possible therapeutic targets since it has been demonstrated its participation in the development of different types of cancer, regulating diverse aspects of the tumor behavior, such as cell proliferation, apoptosis, cell migration and invasion. Among the channels which involving has been demonstrated are the voltage dependent calcium channels (VDCCs) Cav3.1 and Cav3.2 and the potassium channel *Eter à-go-go-1* (Eag1).

It has been reported that an increase in the expression of the channel Cav3.2 favors the tumor development, activating the cellular proliferation and inhibiting apoptosis, acting possibly as an oncogene; while loss or silencing of the Cav3.1 channel generates aberrant cells favoring the tumor progression, suggesting a role as a tumor suppressor. By the other side, the potassium channel Eag1 has been observed with a limited expression in normal tissues, but highly expressed in tumoral tissue from different types of cancer, favoring also the tumor development. Treatment with astemizole, a drug that blocks the Eag1 channel has demonstrated an important effect inhibiting the tumor development, since this treatment with this drug generates a decrease in the cell proliferation and tumor formation in mice transplanted with cells expressing this channel; suggesting that Eag1 could be a convenient therapeutic target.

In this project, we studied in cells derived from prostatic tissue the mRNA expression and protein level of the ionic channels Cav3.1, Cav3.2 and Eag1; as well as the effect of the astemizole treatment on cell proliferation and apoptosis. The cell model was integrated by four cell lines with particular characteristics: RWPE1 (non-invasive); WPE-NB22 (poorly invasive); WPE-NB14 (moderately invasive) and WPE-NB26 (highly invasive); covering the different steps in PC development. The mRNA expression level of the channels was

evaluated by quantitative RT-PCR, and the protein levels by immunofluorescence and immunohistochemistry. Cell proliferation and apoptosis were evaluated by Alamar blue assay, MTT reduction and Flow Cytometry.

The analysis of the expression of the channels Cav3.1 and Cav3.2 showed not significant differences between the cell lines in the model. Interestingly, by Patch clamp assays, was not possible to detect activity of these channels in the entire cell model, suggesting that these channels are not involved in the invasive phenotype of this cell model.

Interestingly, although the mRNA expression of the Eag1 channel was detected with similar levels in the initial and final steps of the model (RWPE1 and WPE-NB26), significant differences were observed in the protein level and subcellular localization, detecting higher amount of Eag1 in the WPE-NB26 cell line (the most invasive in the model), compared to the RWPE1 cell line; but particularly the distribution observed in RWPE1 the protein was located only in the cytoplasm, while in WPE-NB26 cells the protein was distributed both, in cell cytoplasm and nucleus, suggesting novel and undescribed functions for this protein.

Treatment of these cell lines with the drug astemizole at nanomolar concentrations, provoked a significant decrease in cell proliferation and the increase in the apoptosis, only in the WPE1-NB26 cells, that express abundantly the Eag1 channel. These results suggest that Eag1 could be involved in PC development and that astemizole, a drug that blocks the activity of this channel, could be considered for PC treatment in patients with high levels of the protein, after performing the necessary assays to validate this therapeutic approach.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de próstata (CP) es el segundo cáncer más común en hombres, después del cáncer del pulmón. En el 2012, 1.1 millones de hombres fueron diagnosticados con cáncer de próstata; el 70% de los casos ocurrieron en regiones más desarrolladas, teniendo mayor incidencia en: Australia, Nueva Zelanda, Norteamérica, Norte y Oeste de Europa y en regiones menos desarrollados como el Caribe, sur de África y Asia [1-3]. En el 2014 los Estados Unidos tuvo la mayor incidencia en este tipo de cáncer con un 27% de nuevos casos y el segundo en mortalidad [4]; en el mismo año, el CP en México fue el principal tumor maligno en hombres, con una mayor incidencia en hombres mayores de 65 años [3]. Debido al incremento en la incidencia y mortalidad en los últimos años, el CP ha ganado relevancia a nivel mundial.

1.1. El cáncer de próstata.

1.1.1. Características del cáncer de próstata

La glándula prostática es un órgano del tamaño de una nuez que rodea la uretra en la base de la vejiga y produce componentes importantes del líquido seminal. A pesar de que la próstata adulta pierde su estructura lobular esta se encuentra constituida por una zona central, una zona de transición periuretral y una zona periférica junto con estroma fibromuscular anterior. La zona periférica es la que ocupa más volumen y es en la región que desarrolla con mayor frecuencia el carcinomas de la próstata, y la hiperplasia prostática, la cual es una lesión benigna que es encontrada en la zona de transición. A nivel histológico la próstata contiene un epitelio pseudoestratificado con tres diferentes tipo de células epiteliales: luminales, basales, y neuroendocrinas. Las células epiteliales forman una capa continua de células columnares polarizadas que producen proteínas de secreción y expresan marcadores característicos como citoqueratina 8 y 18

así como altos niveles de receptor de andrógenos (AR). Las células basales están localizadas debajo del epitelio luminal y expresan p63 y citoqueratinas de alto peso molecular (34βE12), así como citoqueratinas 5 y 14, y receptor de andrógenos (AR) en niveles bajos o casi indetectables. Finalmente las células neuroendocrinas que son células raras con funciones desconocidas que expresan marcadores neuroendocrinos como cromogranina A y sinaptofisina, pero son negativas a AR [5].

El CP es una patología multifocal que aparece en la glándula prostática la cual es sitio de múltiples neoplasias y eventos de transformación muchos de los cuales dan lugar solo a cáncer de próstata latente que no progresa en una enfermedad clínicamente detectable. La neoplasia intraepitelial prostática (PIN) es uno de los primeros pasos de iniciación de CP el cual se caracteriza a nivel histológico por la aparición de hiperplasia luminal epitelial, reducción de células basales, alargamiento del núcleo y nucléolo, hiperchromacia citoplasmática y atipia nuclear. Adicionalmente la PIN de alto grado presenta elevación de marcadores de proliferación celular (Fig. 1). A diferencia del cáncer de próstata, en la PIN las células basales se encuentran reducidas en número o se encuentran ausentes; la progresión de estas lesiones de bajo grado PIN evolucionan en lesiones más avanzadas como adenocarcinomas (Fig.1). El 95% de cánceres de próstata corresponden a los adenocarcinomas (Fig.1) que presentan un fenotipo luminal, ausencia de p63, expresión de citoqueratina 5/14 y expresión de AR; otros tipos de cánceres como adenocarcinoma ductal, carcinoma mucinoso y el carcinoma de anillo son extremadamente raros. También existe el CP neuroendocrino el cual constituye un pequeño grupo de pequeños carcinomas que corresponde al 2% de los cánceres de próstata; sin embargo en adenocarcinomas es más común observar regiones focales de células neuroendocrinas [6].

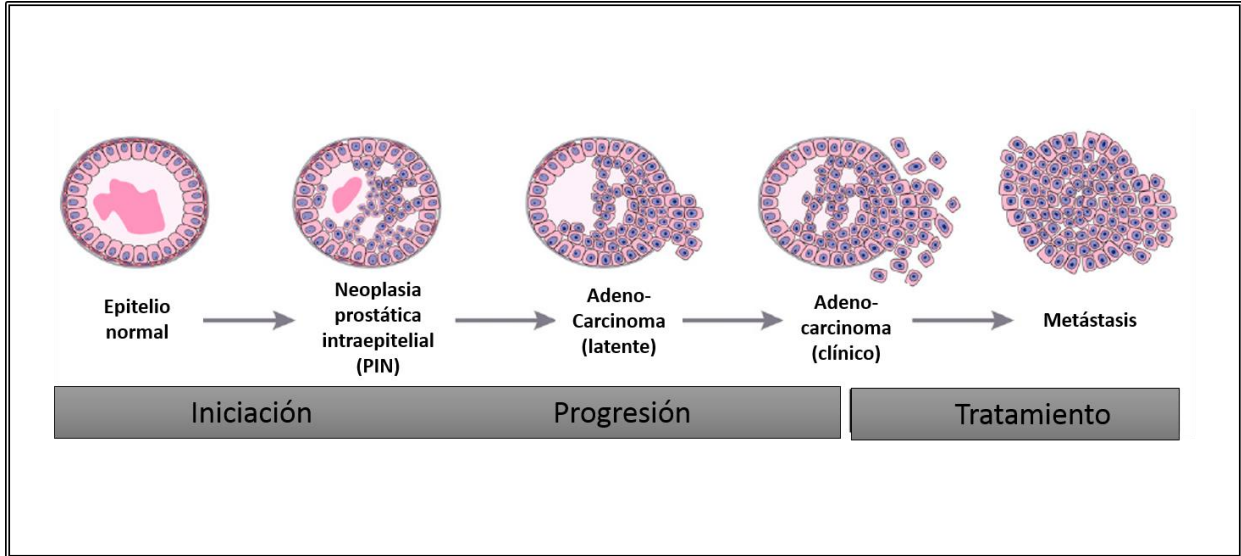


Fig. 1.- Progresión del cáncer de próstata. Representación de las diferentes etapas del cáncer de próstata, desde la transformación del epitelio normal que pasa a convertirse en una lesión no cancerosa (PIN), la cual puede tener una progresión hacia adenocarcinoma y esta evolucionar a etapas más avanzadas e independientes de andrógenos generando metástasis. Tomada y modificada de [6]

Los tumores neuroendocrinos son reconocidos como una subcategoría única de varios órganos epiteliales. Los tumores de células pequeñas o tumores neuroendocrinos de pulmón comprenden la mayor parte de esta particular variante de carcinoma; sin embargo en otros órganos epiteliales como la próstata también cuentan con células neuroendocrinas (NE) intercaladas dentro de las células epiteliales secretorias. Este tipo de células tiende a producir neuropéptidos y factores neuroendocrinos de los cuales se desconoce su función exacta pero que son muy importantes para estimular y regular la función secretoria normal de la próstata [5] (Fig. 2).

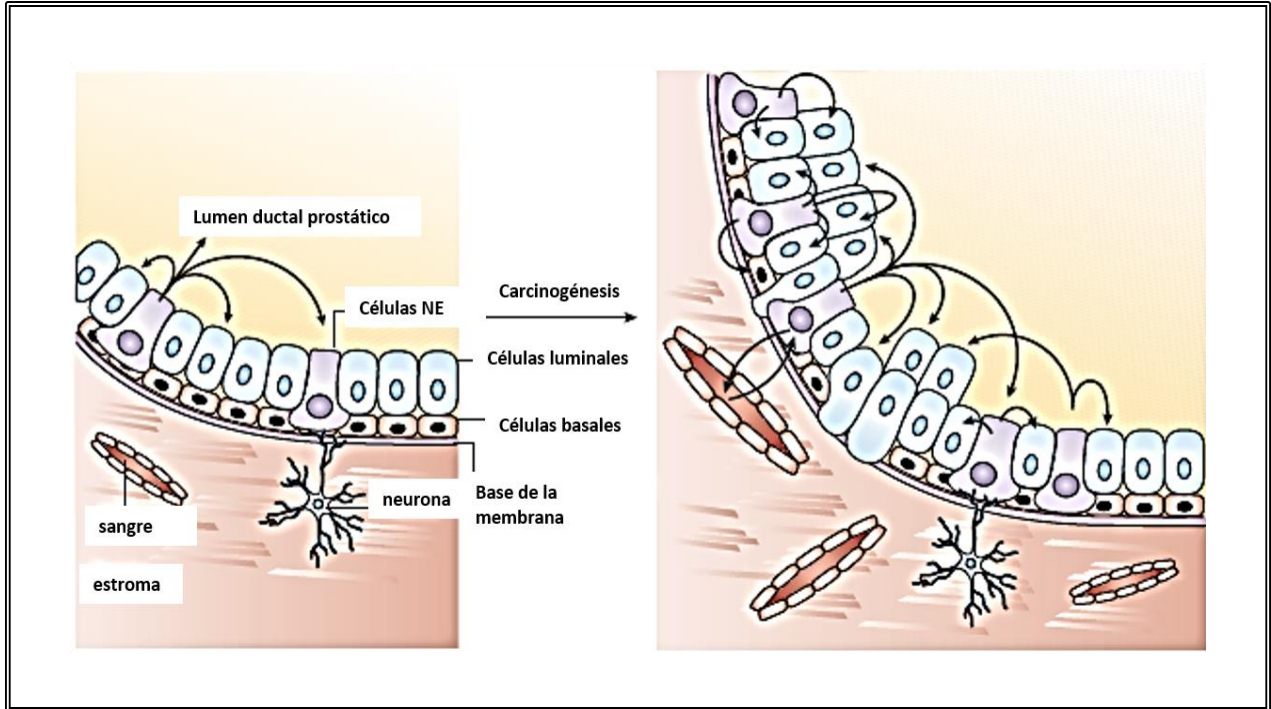


Fig. 2.- Papel de las células neuroendocrinas en cáncer de próstata. El epitelio prostático se encuentra intercalado con las células neuroendocrinas. Estas células liberan neuropeptidos especializados, elementos neuroendocrinos incluyendo cromogranina A que estimula y regula las funciones secretorias de la próstata normal. Una inapropiada regulación de estas células facilita la carcinogénesis, proliferación y cambio del tejido epitelial debido a la pérdida de células basales, angiogénesis, acumulación de epitelio luminal prostático, e invasión los cuales son característicos del carcinoma de próstata. Tomada y modificada de [5].

Las células NE son componentes normales de muchos tejidos, sin embargo la expansión anormal de esta población a precursores malignos es una característica común de la progresión del cáncer (Fig. 2). La diferenciación de las células NE aparece en muchas neoplasias, incluyendo los más comunes carcinomas de colon, pulmón, mama, próstata y usualmente indica un pobre pronóstico. La función primaria de las células NE es la producción de péptidos y aminos que regulan el desarrollo de células adyacentes de manera endocrina o paracrina; estos péptidos o neuropeptidos que se secretan actúan como factores de crecimiento en el cáncer [7]. En cáncer de próstata, la diferenciación de células neuroendocrinas (NED) incrementan en: tumores de alto grado, eliminación de andrógenos y el tratamiento hormonal [5, 8]; esto se debe a que las NED son células que no expresan AR por lo cual esta células son resistentes a la de-privación

de andrógenos y a la terapia hormonal; además de que este tipo de células causan la liberación de bombesina y calcitonina, previenen la apoptosis, promueven la neovascularización y favorecen la liberación del factor angiogénico IL-8 y VEGF, favoreciendo e incrementando la agresividad, invasión, metástasis y pobre diagnóstico, además de conferir resistencia a la apoptosis en células no neuroendocrinas vecinas [8]. Este tipo de cáncer se desarrolla lentamente y en muchos casos no presenta síntomas aparentes; esto dificulta el diagnóstico y no permite que sea detectado tempranamente. Las células en este tipo de cáncer se vuelven resistentes a la castración provocando la recurrencia del tumor diseminándose rápidamente generando metástasis en diferentes órganos como pulmón, hígado y hueso [6, 9].

1.1.2. Factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de próstata

Los principales factores de riesgo que predisponen al desarrollo de este cáncer son: la historia familiar, la dieta, la edad y la etnia, así como cambios a nivel molecular como modificaciones en el receptor de andrógenos, inflamación crónica, estrés oxidativo, daño al DNA y modificaciones epigenéticas [6, 10-12].

-Historia familiar: Es uno de los factores de riesgo más asociados al desarrollo de este cáncer; se estima que entre un 5-10% de los casos con este cáncer tienen un origen genético con características de segregación Mendeliana. Algunos estudios han propuesto que hombres con antecedentes familiares de cáncer de próstata desarrollan un cáncer más agresivo a edades más tempranas que aquellos que no presentan una historia familiar con este tipo de cáncer [10, 12-15].

-Edad: Es otro factor de riesgo importante para desarrollar este cáncer. Se ha visto que los casos de incidencia de CP aumentan conforme es más avanzada la edad desarrollándose principalmente en hombres entre 60 y 70 años que en hombres más jóvenes [14-16]; con una frecuencia de diagnóstico entre los 72-74 años de edad ya que el 85% de los pacientes son diagnosticados después de los 65 años, antes de esta edad

el riesgo a nivel mundial de tener este tipo de cáncer se estima alrededor del 0.5% al 20% [17].

-Raza: La raza es un factor importante que predispone a desarrollar este tipo de cáncer. La más alta incidencia de CP en el mundo ocurre en hombres afroamericanos; teniendo menor incidencia en hombres asiáticos [10, 11, 18]. La incidencia en hombres afroamericanos es de 60% siendo mucho más alta que en poblaciones de raza blanca [14, 15]. Las diferencias en la etnia que favorecen el desarrollo de este cáncer probablemente se deban a factores genéticos, factores ambientales, factores relacionados a la salud, la dieta (aumento del consumo de dieta rica en grasas), diferencias en el locus AR y niveles de antígeno prostático específico (PSA), los cuales son mucho mayores en poblaciones afroamericanas [16, 18].

-Hormonas y AR: Los andrógenos son uno de los factores más importantes y uno de los principales responsables del desarrollo, malignidad y recaída de este cáncer; ya que tanto los andrógenos como el receptor de andrógenos (AR) se encuentran alterados y sobre-expresados en el CP [5, 16, 19]. La próstata es una glándula endocrina que responde a hormonas esteroides debido a sus receptores específicos como el AR, el cual es un receptor nuclear que juega un papel en el desarrollo de la próstata normal y el cáncer. Uno de los andrógenos más abundantes en la próstata y el CP es la testosterona, la cual es sintetizada por los testículos y convierte a este en un metabolito activo a la dihidrotestosterona, a través de la activación mediada por la 5 α -reductasa. Las glándulas adrenales también sintetizan una menor cantidad de especies de andrógenos, aunque en menor cantidad, como la androstenediona y la dihidroepiandrosterona (DHEA), la cual es convertida en testosterona [5].

En la próstata el AR media la actividad de los andrógenos tanto en la próstata normal como en el CP [20] y la testosterona, así como sus derivados como la androstenediona, favorecen el desarrollo normal de la próstata; ya que la testosterona es importante para el mantenimiento normal y saludable del tejido prostático; sin embargo, la testosterona también favorece el desarrollo y progresión del CP [6].

El CP inicialmente es dependiente de andrógenos, pero eventualmente se vuelve independiente de andrógenos después de la terapia de deprivación de andrógenos. La independencia de andrógenos se caracteriza por la pérdida heterogénea de la expresión del receptor de andrógenos; algunos reportes muestran que las líneas de cáncer de próstata negativas a AR presentan una metilación aberrante, ya que se ha observado que el tratamiento con 5,6-dihidro-5-azacitidina, un inhibidor de la DNA metiltransferasa puede restaurar la sensibilidad a andrógenos debido a la des-metilación del receptor, lo que sugiere que el silenciamiento epigenético del AR puede ser un mecanismo para la independencia de andrógenos [20]. Estudios sobre la participación de los andrógenos en CP han demostrado también que aquellos hombres castrados durante la pubertad, que presentan anormalidades en el metabolismo de andrógenos o con deficiencia en la producción de andrógenos no llegan a desarrollar este tipo de cáncer [5, 15], por esta razón los andrógenos constituyen uno de los principales blancos terapéuticos; debido a esto, las terapias convencionales para este cáncer se basan en la eliminación de andrógenos por castración o el uso de antagonistas del AR. [5, 16, 19].

En los pacientes con CP la deprivación de andrógenos es la terapia de elección la cual se basa en la administración y liberación de análogos de la hormona gonadotropina o la castración por cirugía en combinación con anti-andrógenos como flutamida o bicalutamida. Con el tratamiento para la deprivación de andrógenos se manifiesta la independencia de andrógenos en el tejido prostático y con ello un regreso a estadios anteriores del cáncer; durante esta etapa, las células prostáticas continúan creciendo aun cuando los andrógenos han sido removidos. El crecimiento dependiente de andrógenos se debe a diversos mecanismos descritos que tiene el receptor de andrógenos para retener la actividad de señalización en el cáncer de próstata. Estos mecanismos incluyen: amplificación del número de copias del AR en aproximadamente un tercio de los carcinomas resistentes a la castración, mientras que otros tumores tienen del 10-30% de ganancia de función del AR lo cual confiere una mayor estabilidad proteica, mayor sensibilidad a los andrógenos, respuesta a otros esteroides, actividad dependiente de ligando o aumento del reclutamiento de proteínas coactivadoras de AR,

isoformas generadas por “splicing” alternativo que las mantiene constitutivamente activas y finalmente mecanismo inusuales que incrementa la señalización endógena de AR debido a la expresión endógena de enzimas sintéticas de andrógenos que permiten la síntesis de *novo* de andrógenos o la conversión de andrógenos suprarrenales más débiles como testosterona o dihidrotestosterona [6].

Debido a lo anterior, el paso de independencia a andrógeno en donde los pacientes ya no responden a la terapia hormonal debido a alteraciones en el AR, complica el tratamiento, ya que el paciente no responde a la deprivación de andrógenos, es por eso que la investigaciones se han enfocado a encontrar nuevos blancos terapéuticos que puedan ser útiles en inhibir el paso a la independencia de andrógenos.

-Mutaciones: Las alteraciones en diferentes genes son factores que también están involucrados en el desarrollo del CP. Entre las alteraciones genéticas que se han identificado como causas del CP están los polimorfismos (SNPs) en múltiples secuencias del cromosoma 8q24 próxima a MYC en el locus NKX3.1 y polimorfismos de los genes que codifican para: 5 α -reductasa, receptor de andrógenos, receptor de la vitamina D entre otros [6, 16, 21].

1.1.3. Métodos de diagnóstico y detección del cáncer de próstata

Los métodos de detección empleado para este tipo de cáncer son principalmente marcadores séricos como: la fosfatasa ácida prostática (PAP), la cual es el primer marcador sérico empleado para monitorear al cáncer de próstata desde 1940 y el PSA detectado por primera vez en el líquido seminal en 1971 [5]. El PSA permitió desde su descubrimiento mejorar el diagnóstico de este tipo de cáncer permitiendo detectar un mayor número de CP en etapas tempranas; sin embargo incluso con el uso de estos marcadores séricos existen limitaciones en su uso ya que estos también se encuentran

elevados en otras patologías como: hiperplasia prostática benigna, prostatitis, retención urinaria aguda y falla renal, siendo además no específica del tejido prostático [5, 22, 23].

En conjunto con el uso de los biomarcadores PAP y PSA se emplean otros métodos de detección como: examen digital rectal, ultrasonido transrectal, (TRUS), toma de biopsia, clasificación histopatológica del tejido prostático (Gleason score) y escáner de huesos en caso de metástasis, lo cual resulta en un diagnóstico más preciso y oportuno [22-24]; sin embargo muchas de estas herramientas empleadas solo determinan la presencia del tumor y en muchos casos cuando este se encuentra en una etapa avanzada, por lo que el diagnóstico oportuno en etapas tempranas así como el tratamiento se vuelve un aspecto crítico durante el desarrollo del CP. En el caso del tratamiento empleado para este tipo de cáncer la deprivación de andrógenos es el tratamiento por elección; desafortunadamente en muchos casos la deprivación de andrógenos no da al tratamiento una ventaja significativa en aquellos cánceres que se adaptan a las nuevas condiciones, volviéndose generalmente independientes de andrógenos, generándose tumores recurrentes y más agresivos [9, 19]. Nuevas investigaciones se han enfocado en estudiar nuevos blancos moleculares como oncogenes o posibles supresores de tumor que puedan ser empleados en este tipo de cáncer como blancos terapéuticos, que permitan disminuir la agresividad del cáncer y actúen en la etapa de independencia de andrógenos; es por eso que recientemente se ha propuesto a los canales iónicos como posibles blancos terapéuticos ya que se ha visto que participan en el desarrollo del cáncer.

1.2. Canales iónicos en cáncer.

Los canales iónicos participan en todas las funciones y procesos básicos de las células como mantenimiento de la homeostasis, proliferación, diferenciación y apoptosis. El principal mecanismo por el cual los canales iónicos participan en estos procesos normales tan importante es mediante el flujo iónico y señales iónicas que permiten regular el volumen celular y mantener el potencial de membrana, participando así en señales intracelulares que activan respuestas celulares específicas. Se ha reportado que

diferentes canales iónicos se encuentran expresados en diferentes tipos de cánceres, regulando diferentes aspectos del comportamiento del tumor (proliferación celular, apoptosis, migración e invasión) (Fig. 3) [25].

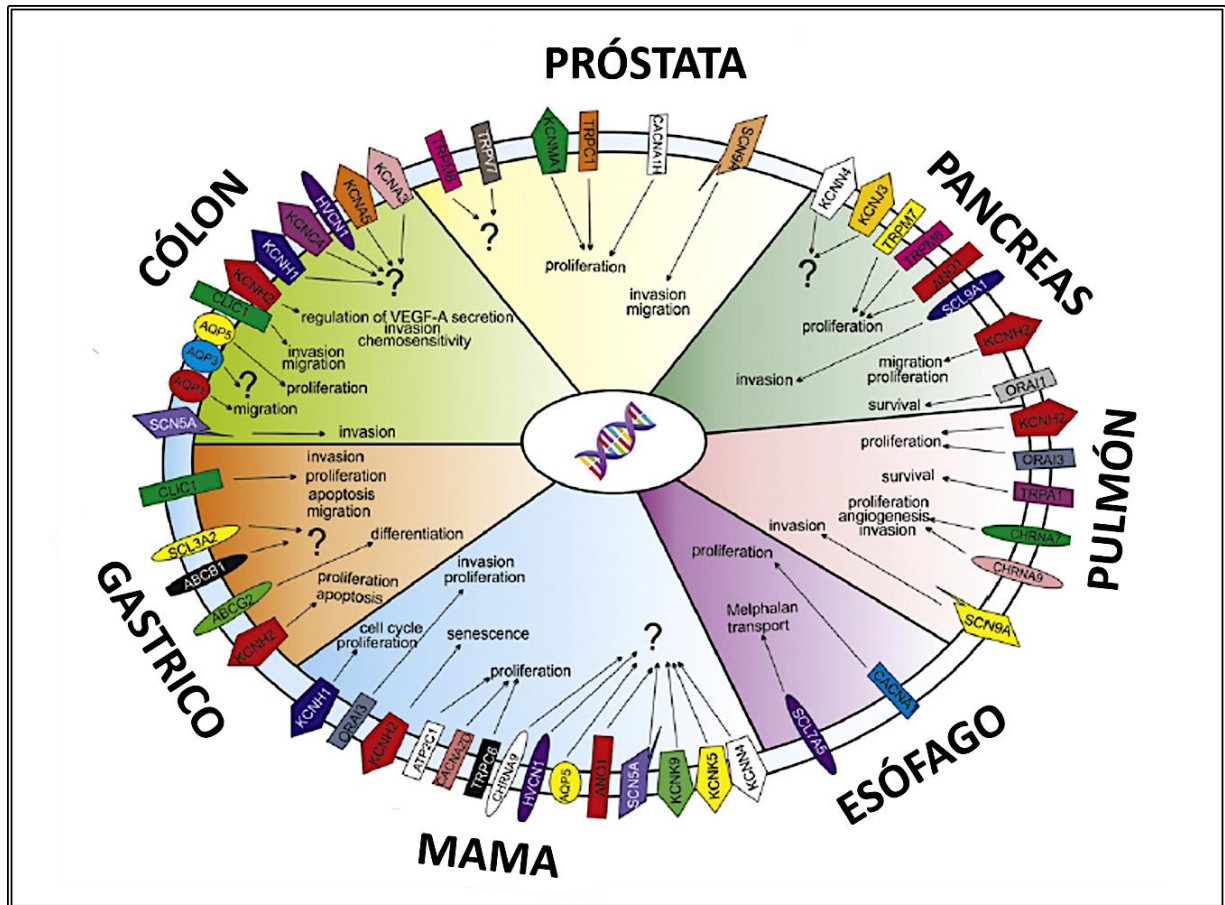


Fig. 3.- Perfil y papel de los canales iónicos en cáncer. Papel que juegan los canales iónicos en diferentes procesos celulares como apoptosis, proliferación, invasión y senescencia en varios tipos de cáncer: (próstata, páncreas, pulmón, esófago, mama, gástrico y colon). Tomada y modificada de [25].

En tumores primarios, diferentes canales iónicos se encuentran sobre-expresados o sub-expresados; de lo que se deduce que cambios en la expresión de estos canales genera una progresión anormal de la respuesta celular donde ellos participan, siendo una de las causas de la transformación maligna de las células que da como lugar a un aumento en la proliferación aberrante, diferenciación y pérdida de apoptosis que sugiere el crecimiento anormal de un tejido, eventualmente favoreciendo un crecimiento

descontrolado, e invasión (Fig. 3) [25, 26]. La idea de que los canales iónicos están involucrados en la progresión anormal de ciertos procesos en cáncer, surge por primera vez en 1980 cuando se observó que los bloqueadores de algunos canales como K^+ y Ca^{2+} eran capaces de inhibir *in vitro* la proliferación celular y la apoptosis [26].

Durante el desarrollo del CP la expresión de varios genes entre ellos canales iónicos se ve alterada favoreciendo el desarrollo de este cáncer; ya que se ha observado que estos participan de diferentes maneras en la evolución del CP; por lo que algunas investigaciones se han enfocado en el estudio de los canales iónicos y su papel en el desarrollo de esta malignidad. Algunas nuevas investigaciones sobre el CP muestran que en comparación con la próstata normal los canales iónicos de Cl^- , Ca^{2+} , K^+ y Na^{2+} presentan diferente expresión durante su evolución [25, 26]; por esta razón en este y otros tipos de cánceres, los canales iónicos se han vuelto clave importante en el entendimiento de su desarrollo; por lo que recientemente en CP algunos de estos canales han sido propuestos como posibles biomarcadores o blancos terapéuticos.

1.2.1. Canales de calcio

El calcio es uno de los cinco elementos más abundantes en la tierra y el catión más abundante en el cuerpo humano. El ion calcio sirve como un mensajero intracelular esencial en varias vías de traducción de señales y en la homeostasis celular. Los incrementos de calcio en la célula desencadenan una variedad de procesos celulares como: contracción muscular, quimiotaxis, plasticidad neuronal, secreción de hormonas y neurotransmisores (Fig. 4B) [27, 28]. El calcio en las células es muy importante ya que participa en procesos como proliferación, diferenciación y apoptosis entre otros y la activación de estos canales junto con la entrada de calcio a la célula genera una despolarización de la membrana activando de esta manera a otros canales iónicos [26, 29]. El calcio en las células está altamente regulado dentro de los compartimentos celulares para lograr la regulación de la señalización celular; la cual se mantiene en niveles bajos (~ 100 nM), cuando las células se encuentran en reposo; sin embargo con

estimulación los niveles de calcio aumentan globalmente (~ 1.2 mM). Dentro de la célula hay un gran gradiente de concentración de Ca^{2+} entre el citosol y algunos organelos, como el sarcoplasma y el retículo endoplásmico; estos organelos actúan como reservas de Ca^{2+} , facilitando su enriquecimiento mediante proteínas que unen Ca^{2+} , como calsecuestrina y calreticulina1. En estas reservas de calcio, el Inositol (1,4,5,) P3Rs o RYRs se encargan de regular la liberación de calcio. La entrada de calcio a las células está controlada por varios mecanismos incluyendo canales dependientes de voltaje (VOC), canales activados por ATPasas (PMCA), SMOC (activados por segundos mensajeros), SOC (activados por depleción del calcio intracelular) y ROC (activados por hormonas y neurotransmisores), canales intercambiadores $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+}$ (NCX) y canales de almacenamiento que se abren después del agotamiento interno de calcio (Fig. 4 A). Una de las vías que es sensible a los cambios de calcio intracelular son las cinasas reguladas por la vía ERK/MAPK, que es una de las vías efectoras de la proteína pequeña de unión a Ras GTP que regula la proliferación y la diferenciación [30-32].

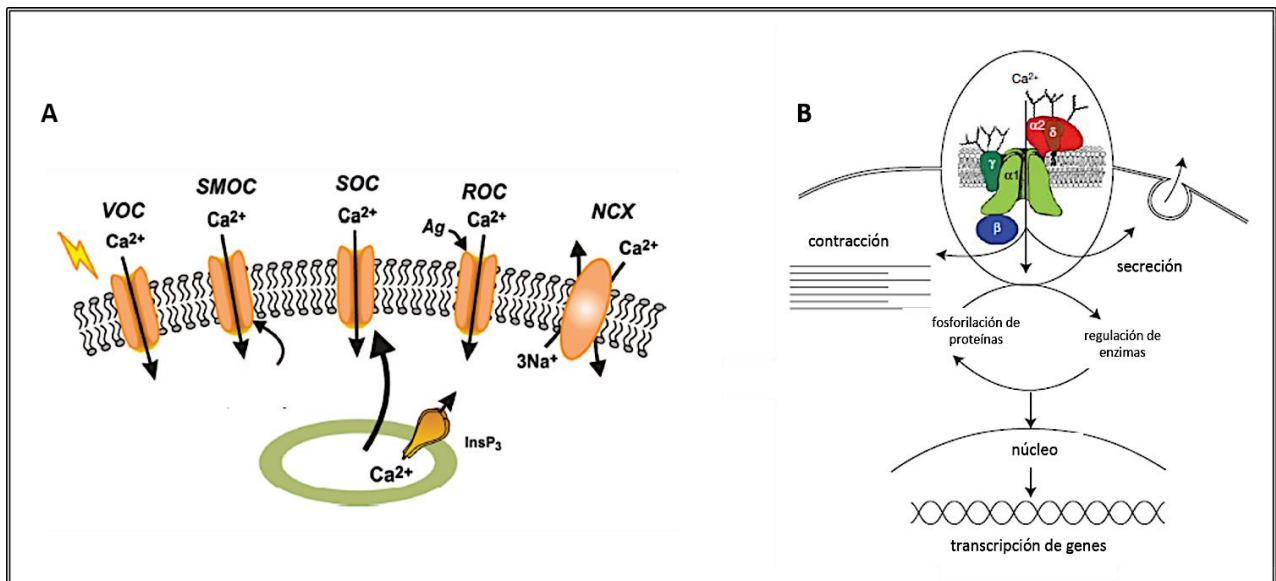


Fig. 4.- Función y tipos de canales de Ca^{2+} . A) El calcio entra a través de la membrana plasmática por medio de varios tipos de canales VOC, SMOC, SOC y ROC. B) Los canales de calcio dependientes de voltaje están formados por 5 subunidades: $\alpha 1$, β , $\alpha 2\delta$ y γ . La entrada de calcio a través de estos canales inicia numerosas señales intracelulares que favorecen la activación de varios procesos celulares como contracción, secreción, transmisión sináptica, regulación de enzimas, fosforilación, desfosforilación de proteínas y transcripción de genes. Tomado y modificado de [28, 33].

1.2.1.1. Características y función de los canales de calcio

La entrada de calcio al interior de la célula se da a través de diferentes mecanismos en donde la célula usa las señales de calcio externas activando varios canales de entrada con propiedades diferentes.

Los canales de calcio son proteínas integrales de membrana que permiten el flujo selectivo de calcio a favor del gradiente electroquímico los cuales se pueden clasificar con base a su función celular o su mecanismo de activación en:

- **Canales que operan con voltaje (VOCs).**

Es una de las clases más estudiadas que requieren de la despolarización celular para su activación; son selectivos a calcio y modulados de manera selectiva por neurotransmisores, proteínas G y segundos mensajeros; siendo dominantes en células excitables como células cardíacas, neuronales, musculares y de Purkinje. Los canales de calcio dependientes de voltaje (VDCCs) proporcionan una entrada rápida de calcio dependiente de la concentración extracelular en el citoplasma en muchos tipos de células como células nerviosas, musculares y células endocrinas [32]. En cáncer se ha visto que estos canales estimula el flujo de calcio promoviendo la migración celular [34].

- **Canales de calcio que no operan por voltaje**

- 1) ROCs (canales que operan a través de receptores): Son canales que se activan en respuesta a la unión de ligandos externos, permitiendo la entrada de calcio. Dos subclases de canales ROC pueden ser distinguidos por su dependencia al potencial de membrana; el canal dependiente de ligando como los receptores NMDARs (Receptores de N-metil-D_aspartato) los cuales se abren en respuesta al glutamato y permiten la entrada de cantidades significativas de calcio [32].

- 2) SMOCs (canales activados por segundo mensajeros): Están regulados por moléculas que actúan como segundos mensajeros al interior de la célula [32].
- 3) SOCs son el mecanismo de mayor flujo de calcio. Estos se encuentran en los depósitos de calcio y en general son predominantes en células no excitables aunque también se presenta en células excitables y son sensibles a una gran variedad de estímulos [32, 35]. Estos canales se activan mediante el acoplamiento de los receptores de superficie a través de las proteínas G o una cascada de tirosina cinasas que activan la fosfolipasa C para escindir el PIP₂ (fosfatidilinositol 4,5 bifosfato) y producir inositol-1,4,5 trifosfato. Estos canales se llaman así porque responden a la reducción de Ca²⁺ intraluminal en el retículo endoplásmico (RE), por la liberación de calcio inducida por IP₃ a través de los receptores IP₃ en la membrana del RE. Dentro de estos están involucrados un gran número de canales no selectivos a calcio como ORA1, STIM 1 y 2, y los canales TRP [32, 35].

En CP estos canales juegan un papel muy importante en diversos procesos celulares. La disminución de la expresión de los canales VOC (STIM1 y ORA1) en este tipo de cáncer protege a las células de las señales de apoptosis [26, 36, 37]. Los canales TRPCs participan también en la apoptosis y en la proliferación celular dependiendo del subtipo de canal TRPCs que se esté sobre-expresando [25]. Los canales TRPC6 y TRPC1 actúa como pro-angiogénicos [34], los canales TRPV4 y TRPM7 participan en proliferación y migración celular [34] y el canal TRPV6 su expresión es nula en próstata sana, mientras que en CP se encuentra altamente expresado este canal [25], favoreciendo la carcinogénesis del CP; ya que estimula la activación de flujos de calcio favoreciendo la activación del factor nuclear de activación de células T (NFAT) modulando así la proliferación y promoviendo la resistencia la apoptosis [37].

- **Bombas e intercambiadores**

Son encargados de remover el calcio del citoplasma. Las bombas tienen importancia durante el mantenimiento de la homeostasis ya que ellas mantienen los niveles de calcio

en reposo en 100 nM y se aseguran de que los almacenamientos internos estén llenos. Cuatro diferentes bombas son las responsables de estas funciones: PMCA (ATPasa de Ca^{2+}), NCX (intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$), SERCA y el transportador “uniport” mitocondrial. Estas proteínas tienen diferentes mecanismos para llevar a cabo su actividad. Las bombas PMCA y SERCA tienen menor tasa de transporte pero altas afinidades, lo que significa que pueden responder a elevaciones modestas de niveles de Ca^{2+} ; mientras que los intercambiadores NCX y el transportador uniporte mitocondrial tienen tasas de transporte mucho mayor. La diversidad molecular de los PMCA, SERCA, NCX le permite a las células seleccionar la combinación de bombas a usar que cumplan exactamente con la señalización de Ca^{2+} [27, 32]. En CP una disminución de la bomba SERCA2b favorece el paso de la diferenciación neuroendocrina y el paso a independencia de andrógenos; siendo también una de las causas de resistencia a la apoptosis [31].

1.2.1.2. Canales de calcio dependientes de voltaje (VDCCs).

Los VDCC fueron por primera vez identificados por Fatt y Katz en 1953. Posteriormente se descubrió que había diferentes subtipos de estos canales en células excitables. En 1980 fue purificada una proteína de los VDCCs encontrando que estos canales estaban formados por varias subunidades. La principal subunidad de estos canales fue nombrada $\alpha 1$ y las subunidades auxiliares, β , $\alpha 2$, δ y γ (Fig. 5 A) las cuales pueden afectar la apertura del canal, su modulación, farmacología y expresión. Posteriormente en 1990 estudios de mutaciones permitieron precisar también que existían sitios de unión a ligandos para dihidroxi pirimidinas (DHPs), fenil-alcalinaminas (PAAs) y benzodiazepinas (BTZ); así como sitios de fosforilación y estructuras moleculares responsables de la regulación del voltaje, del flujo de calcio, así como de su activación e inactivación [38, 39].

El estudio de estos canales han tomado gran interés debido a las características particulares de estos, que permiten generar una rápida corriente de calcio dependiente

de voltaje permitiendo así, la entrada de calcio extracelular dentro del citoplasma en muchos tipos celulares como nervios, músculos y células neuroendocrinas. El calcio entra por este tipo de canales actuando como segundo mensajero iniciando así diferentes eventos como: contracción muscular, secreción de hormonas, regulación enzimática, expresión de genes y varios procesos biológicos. Estas señales de calcio son diferentes en cada uno de los tipos de células debido a que existen varios subtipos de canales VDCCs que median la entrada de calcio con diferente regulación, fisiología y farmacología [33].

1.2.1.3. Características de los canales de calcio dependientes de voltaje VDCCs

La primera clasificación que tuvieron estos canales se basó en propiedades electrofisiológicas y farmacológicas, ya que algunos de ellos requerían despolarizaciones pequeñas para activarse, mientras que otros necesitaban altas despolarizaciones para abrirse; de acuerdo con esto los VDCCs se dividieron en activados por bajos voltajes (LVA) y activados por altos voltajes (HVA). Los canales LVA se activan a voltajes de -70mV mientras que los HVA tienen una activación a voltajes más positivos de -20mV, estos últimos se encuentran de manera abundante en músculo esquelético, músculo liso, cardíaco y en neuronas. En 1980, experimentos con neuronas revelaron que algunos canales eran insensibles a las DHPs a los cuales se les llamó canales tipo-N; posteriormente se vio que otros canales de calcio tenían sensibilidad a toxinas de serpientes y arañas. El canal sensible a la ω -conotoxina GVIA se le llamó canal tipo-N, mientras que el canal sensible a la toxina ω -aga IVA fue llamado tipo-P/Q [27, 38] y finalmente se obtuvo una última clasificación de un canal que era activado por voltajes intermedios al cual se le llamó tipo-R, este ocasionalmente es clasificado como un canal activado por voltaje intermedio (IVA) [27].

Se ha visto que los diferentes tipos de canales VDCCs presentan diferentes características y propiedades; su expresión es diferencial entre diferentes tipos de tejidos; con base en esto se dividen en:

- **Canales tipo-L:** Ellos presenta una lenta inactivación y también permiten la entrada de Ba^+ . Estos se encuentran expresados en una gran variedad de tejidos y controlan el flujo de calcio en varias células excitables. Estos canales se encargan de iniciar la liberación de hormonas en células endocrinas y neuronales y también participan en la expresión de genes, integración sináptica y liberación de neurotransmisores.

Este canal presenta cuatro tipos de subunidades α , generando cuatro tipos de canales L (Cav1.1., Cav1.2, Cav1.3 y Cav1.4) [33, 40].

- **Canales tipo N, P/Q y R:** Estos canales se encuentran altamente expresados en el sistema nervioso, en donde conducen las corrientes de calcio pre-sinápticas que inician la transmisión pre-sináptica. Los canales tipo-N se encuentran principalmente en nervios pre-sinápticos y en dendritas neuronales. Los canales P permiten corrientes de calcio en neuronas de Purkinje y son altamente sensibles a la toxina W-agatoxina IVA; mientras que los canales Q registran corrientes de calcio en neuronas cerebelares granulares; este canal es bloqueado por W-agatoxina teniendo baja afinidad. Los canales R presentan corrientes de calcio en neuronas cerebelares y granulares; siendo resistentes a bloqueadores orgánicos y peptídicos [33, 40].

- **Canales tipo-T:** Estos canales controlan la entrada de calcio durante leves despolarizaciones cerca del potencial de reposo, funciones claves como crecimiento celular, contracción muscular, liberación de hormonas, diferenciación y proliferación por lo que estos canales han sido propuestos como blancos terapéuticos en diferentes tipos de enfermedades como hipertensión, angina de

pecho, fibrilación arterial, epilepsia, desórdenes del sueño, obesidad, cáncer, entre otros [40].

Aunque estos canales se expresan en diferentes tejidos, algunos están restringidos a ciertos tipos de tejidos mientras que otros, como los canales tipo L y T, se encuentran en una amplia gama de tipos celulares, a diferencia de los canales N, P/Q y R que se expresan más en células neuronales; esto les permite diferir en las funciones que llevan a cabo.

Al ser estudiados y purificados los canales VCDDs de músculo esquelético se observó que estos canales están conformados por varias subunidades complejas:

- **Subunidad $\alpha 1$:** Es la subunidad principal responsable de las propiedades farmacológicas y electrofisiológicas, con un peso de 200-260 kDa. Se encuentra anclada a la membrana, formada por 4 dominios homólogos transmembranales y cada uno contiene 6 α -hélices que crean 6 segmentos transmembranales y una región del poro entre el segmento 5 y 6; esta unidad regula la activación e inactivación del canal (Fig. 5B) [33, 38].
- **Subunidad β :** Es una sub-unidad auxiliar de los HVA que se co-expresa con la subunidad $\alpha 1$, pesa de 55-60 kDa; sin embargo en los canales LVA no se ha demostrado su co-expresión con la subunidad $\alpha 1$. Se han distinguido por tener α -hélices pero sin segmentos transmembranales; posee 4 isoformas de la unidad β , cada una con múltiples variantes de "splicing". Se encuentra regulada por proteinasas y actúa como un modulador de la apertura del canal y de las propiedades farmacológicas de la subunidad α (Fig. 5 A) [33, 38].
- **Subunidad $\alpha 2\delta$:** Es una proteína de 175 kDa altamente glicosilada y sus unidades $\alpha 2$ y δ están unidas por puentes disulfuro. La unidad δ se encuentra de manera transmembranal y presenta varios sitios hidrofóbicos, esta alberga las regiones importantes para el cambio de activación e inactivación y para modular la

cinética de inactivación; mientras que la unidad δ es extracelular (Fig. 5 A) [33, 38].

- **Subunidad α :** Es una glicoproteína de membrana de 25-38 kDa, con cuatro hélices putativas transmembranales y con un dominio carboxilo y amino intracelular con dos sitios de N-glicosilación. Al principio se creía que esta subunidad solo estaba presente en musculo esquelético pero después también se encontró en cerebro, participando en promover la inactivación del canal (Fig. 5 A) [33, 38].

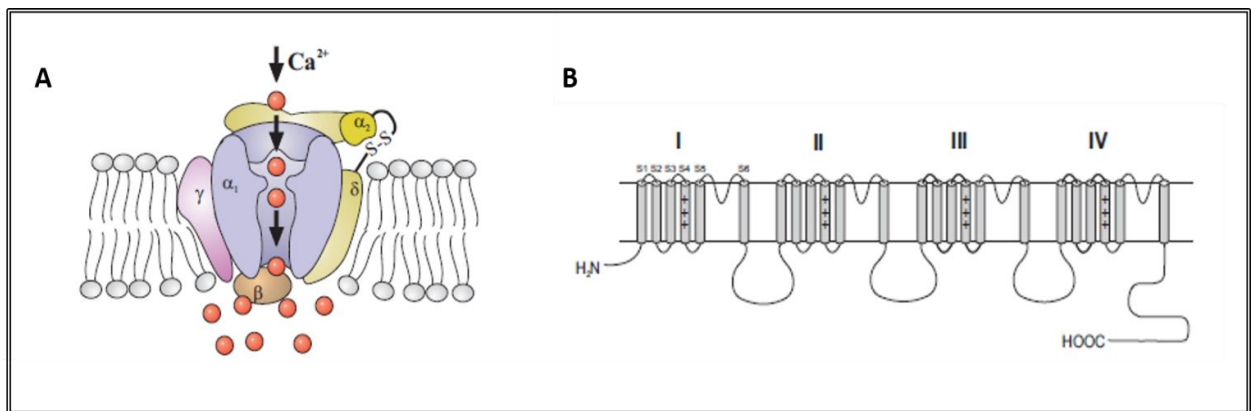


Fig. 5.- Representación esquemática de la estructura de los canales VDCCs. A) La unidad principal de estos canales es la α la cual forma el poro del canal y regula a la subunidades auxiliares: β (transmembranal), $\alpha_2\delta$ (complejo extracelular) y γ (transmembranal). B) La unidad α es la unidad principal ya que algunos canales solo están formados por esta unidad. Está formada por 6 segmentos transmembranales S1-S6, donde cada uno de ellos está formado por 4 dominios. Entre el segmento S5 y S6 se encuentra la región de poro. Tomado y modificado [38].

Estos canales gracias a su variabilidad en sus subunidades se pueden expresar en diferentes tejidos permitiéndoles tener diferentes funciones en órganos como corazón, musculo liso, cerebro y órganos endocrinos. Los canales LVA los cuales presentan mayor diversidad participan en funciones muy variadas como funciones cardiacas, neuronales, secreción de hormonas, desarrollo muscular, contracción muscular y fertilización [41]. También los canales tipo-T han resaltado por tener múltiples funciones, entre otras regular la entrada de calcio principalmente en células no excitables; jugando papeles importantes en el ciclo celular, apoptosis y diferenciación [42, 43].

Además de tener funciones importantes a nivel celular; estudios sobre estos canales han demostrado que ellos también están involucrados en el desarrollo de varios tipos de patologías incluyendo el cáncer. En el caso de los canales HVA tipo-L, se ha observado que existe un aumento de RNAm en muestras de pacientes y en cultivos celulares de cáncer de colon (Caco-2 y T84), siendo propuesto este canal como posible marcador de este tipo de cáncer [44]. En cáncer hasta el momento no existen estudios que relacione a los canales HVA con el desarrollo de CP.

1.2.1.4. Características de los canales de calcio tipo-T

Dentro de la familia de los canales de calcio se encuentran los canales de calcio dependientes de voltaje (VDCCs); a estos canales pertenecen los tipo-T los cuales son activados a voltajes bajos (LVA), por lo que se encargan del control de entrada de Ca^{2+} a despolarizaciones intermedias cercanas al potencial de reposo. Estos canales se expresan en musculo liso y en tejidos de diferentes órganos como corazón, cerebro y en varios órganos endocrinos. Están implicados en funciones cardiacas, en el disparo neuronal, en la secreción de hormonas, desarrollo y contracción muscular, en la fertilización, proliferación, diferenciación y crecimiento celular.

Los canales tipo-T presentan propiedades únicas que facilitan la clasificación de su electrofisiología: 1) su activación es estrictamente dependiente de voltaje, abriéndose a voltajes bajos de -50mV, 2) su inactivación es voltaje dependiente y se completa en 10 milisegundos, 3) su desactivación es lenta y se da a potenciales cercanos al reposo (-60, -50mV), 4) tanto el Ca^{2+} como el Ba^{2+} son acarreados de igual manera, 5) su activación y estado de inactivación se sobrelapan con potenciales cercanos al reposo que dan lugar a una “corriente de ventana” que permite pequeños flujos de calcio [40]. Además tienen un perfil farmacológico único a diferencia de los otros canales VDCCs, ya que se caracterizan por ser medianamente sensibles a las DHPs como nifedipina o nomodipina, pero son sumamente sensibles al mibefradil. Recientemente también se ha encontrado que la kurotoxina, que es una toxina de escorpión tiene efecto en el canal Cav3.1 [39].

La clonación molecular de los genes que codifican para estos canales ha permitido identificar tres diferentes tipos de canales tipo-T, en base a sus diferencias en la formación de su poro o subunidad $\alpha 1$, siendo clasificados en: $\alpha 1G$ (Cav3.1), $\alpha 1H$ (Cav3.2) y $\alpha 1I$ (Cav3.3); los cuales son similares en estructura a los canales Cav1 y Cav2 y su subunidad $\alpha 1$ es independiente de las otras subunidades [33, 38]. Estos canales son los únicos que se activan e inactivan a muy bajos cambios de voltaje siendo muy importantes en la regulación del Ca^{2+} especialmente en tejido no excitable e incluso en algunas células cancerosas no excitables. A bajos voltajes se sabe que los canales tipo-T median un fenómeno muy importante llamado “corriente de ventana” en el cual se sobrelapan los voltajes entre la activación e inactivación generando que los canales no se desactiven por completo permitiendo pequeños flujos de calcio a bajos voltajes o en potenciales de reposo. El efecto de corriente de ventana permite a los canales tipo-T regular la homeostasis del calcio en condiciones de no estimulación o de reposo [41].

La función que llevan a cabo estos canales son varias y muy importantes para las células ya que estos canales participan en el control de la diferenciación y del ciclo celular en varios tipos de tejidos y en células cancerosas. En el proceso del ciclo celular durante la transición de la etapa de G1 a S se encuentran presentes corriente de calcio de canales tipo-T, las cuales disminuyen o están ausentes en todas las demás fases del ciclo celular. La importancia de estos canales en el ciclo celular se debe a que en la transición de G1 a S se requiere de calcio externo para desencadenar la activación de una serie de enzimas como: timidina cinasa, timidilato sintasa, ribonucleotido reductasa y DNA polimerasa; mientras que en la transición de G2 a M el calcio activa enzimas que son críticas para el re-arreglo de microtúbulos y contracción de microfilamentos. En un estudio en células HUVEC se comprobó la gran importancia de estos canales ya que el bloqueo con verapamilo, nifedipina y isradipina causan un arresto en la etapa G0/G1 [41]. Otras de las funciones que llevan a cabo, estos canales, son permitir el latido del corazón debido a la conductancia del calcio a través de estos canales en el nodo sinoatrial del corazón, en las neuronas del tálamo son cruciales en la generación de ráfagas

rítmicas de los potenciales de acción que manejan el eje del sueño y lo controlan, y en la corteza adrenal son importantes en regular la síntesis y secreción de aldosterona [33].

Para llevar a cabo estas funciones en que participan los canales tipo-T, estos también son reguladas de manera importante en las células. Se ha sugerido que estos canales son regulados de manera diferente por varias proteínas como la proteína cinasa A (PKA), la cual incrementa los flujos de corriente del canal. También se ha mostrado por un gran número de estudios que estos canales se encuentran sobre-regulados o desregulados por la activación de la protein-cinasa C (PKC), por la Ca^{2+} /calmodulina-dependiente de la proteína cinasa II (CaMKII) y por la proteína tirosina cinasa (PTX). Así mismo cambios de los niveles de zinc regulan los tres canales Cav3, reduciendo significativamente la cinética de desactivación que como consecuencia genera un aumento de la entrada de calcio a través de Cav3.3. También muchos receptores acoplados a proteínas G son moduladores potenciales de los canales tipo-T en varias células [45, 46]. La expresión aberrante o mutaciones de este canal, puede afectar el control de la corriente de calcio la cual es regulada por estas proteínas; esta falta de regulación está muy relacionada con algunas enfermedades como el cáncer o desordenes, debido a la falta de control apropiado de esto canales tipo-T [45].

1.2.1.5. Canales de calcio tipo-T en cáncer

Los canales tipo-T se expresan en diferentes tipos de tejido tumoral, así como en diferentes tipos de tejido normal como: cerebro, corazón, riñón y musculo liso. Se ha visto la participación de estos canales en el desarrollo de varios tipos de cáncer como mama, cerebro, colon, leucemia, próstata y retinoblastoma [47].

Se ha sugerido que la modulación del Ca^{2+} y de sus canales en el proceso del cáncer pudiera ser empleada como una herramienta terapéutica y/o de diagnóstico; ya que estudios de las bombas y canales de Ca^{2+} en cáncer proponen que estos promueven la progresión tumoral [27, 31].

En general los tejidos no excitables incluyendo el epitelio no expresan canales de calcio dependientes de voltaje, esto debido a que los cambios en los rangos de potencial de membrana son muy pequeños para activar a estos canales; sin embargo estudios recientes han mostrado que los canales tipo-T se encuentran expresados en células cancerosas [41]. En cáncer se ha observado que estos canales se encuentran alterados, participando en la progresión tumoral, metástasis, proliferación y apoptosis; sin embargo aún se desconoce cómo actúan y participan en estos procesos [26, 45].

Tanto el canal Cav3.1 como el Cav3.2 están involucrados en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer. En el caso del canal Cav3.2 un aumento en su expresión favorece el desarrollo tumoral, proliferación celular e inhibición de la apoptosis en hepatocarcinoma, cáncer de mama y esófago, mientras que su bloqueo mediante el uso de fármacos, disminuye el desarrollo canceroso y promueve la apoptosis, lo que sugiere que este canal pudiera estar actuando como un oncogén [41, 48, 49]. En el cáncer de esófago el silenciamiento del canal Cav3.1 mediante un siRNA reduce la proliferación celular vía p53 [7]; mientras que en glioblastoma se ha encontrado que la expresión de Cav3.1 y Cav3.2 disminuye la proliferación celular. Una evidencia adicional de que estos canales están participando en la proliferación de estas células, es que al ser tratadas con baja cantidad de suero, con mibefradil un antagonista de los canales o con oligonucleótidos anti-sentido, se genera una disminución de 50% en la expresión de los canales Cav3.1 (1G) y Cav3.2 (1H) y del 70% en la proliferación celular en las líneas celulares U87MG y N1E-115; mientras que la sobreexpresión del canal Cav3.2 provoca un aumento de dos veces la proliferación celular [50].

En cuanto al canal Cav3.1 se ha observado que la pérdida de la regulación de este, genera células aberrantes y favorece la progresión tumoral [49, 51]. También se ha propuesto que pudiera estar actuando en ciertos tipos de tumores como un gen supresor de tumor, ya que se ha observado que en ciertas líneas de cáncer de colon, mama, pulmón y líneas hematopoyéticas, la región promotora del gen que codifica para este canal se encuentra metilada, por lo tanto inhibida o disminuida su expresión comparada con líneas celulares no cancerosas [52, 53].

En cáncer de mama, en células MCF-7 el silenciamiento del canal Cav3.1 mediante RNA's interferentes y el bloqueo del canal favorece la proliferación celular; así como la disminución de genes que participan en la apoptosis y la sobre-expresión de genes con actividad anti-apoptótica y proliferativa; mientras que la sobre-expresión del canal incrementa la apoptosis; sin embargo en el caso del canal Cav3.2 sucede lo contrario, ya que su silenciamiento disminuye la proliferación celular [54].

1.2.1.6. Canales de calcio tipo-T en cáncer de próstata

En cáncer de próstata se ha visto que existe una desregulación de varios canales iónicos [25]. Dentro de los canales en los que se encuentra alterada su expresión en este tipo de cáncer están los canales tipo-T, de los cuales existen pocos estudios que analicen el papel que estos pueden tener en el desarrollo de este tipo de cáncer [26].

La células NED en cáncer de próstata es uno de los principales factores que favorece su desarrollo, debido a la liberación de mitógenos que participan en la progresión y pobre diagnóstico. Se ha propuesto que los canales tipo-T están involucrados en el desarrollo del CP y en la progresión de este hacia un estado de independencia de andrógenos, debido a que estos canales participan en la estimulación y secreción de mitógenos [55, 56], mediante un incremento de las NED [8, 56, 57].

Estudios de la expresión del canal Cav3.2 en CP han reportado que este se encuentra asociado a la células NED en la línea LNCaP (dependiente de andrógenos), favoreciendo así la liberación de mitógenos que permiten el desarrollo de este cáncer [7]. La expresión del canal Cav3.2 ($\alpha 1H$) en cultivos celulares de células NE mostró que la sobre-expresión de este canal incrementa la proliferación de estas células [56]; en muestras de pacientes también se ha observado un aumento en la expresión del canal Cav3.2 en las células NE [55]. Otras investigaciones han mostrado que esta sobreexpresión del canal se debe al cAMP; ya que se sabe que el cAMP aumenta en pacientes con CP que fueron privados de andrógenos; a su vez, estudios *in vivo* en

células LNCaP han mostrado que el tratamiento con cAMP promueve la diferenciación, independencia de andrógenos, proliferación y también la sobre-regulación de CSE (cistationina- γ -liasa), CBS (cistationina- β -sintasa) y PAP (fosfatasa ácida prostática); esto genera un aumento en el RNAm, proteína y corriente del canal Cav3.2 [58]. Otros estudios también comprobaron que al tratar células LNCaP con IL-6 y c-AMP se promovía la NED y un aumento en la proteína y activación del canal. Estudios en pacientes con cáncer de próstata revelaron que la IL-6 se encontraba elevada en pacientes con carcinoma metastásico de próstata por lo que un aumento de este factor en CP probablemente estuviera elevando al canal Cav3.2 favoreciendo el proceso de NED, el cual es muy importante en el desarrollo de este cáncer y en el paso a la independencia de andrógenos [59]. La transfección del canal Cav3.2 en las líneas celulares LNCaP y PC-3 aumenta la expresión de RNAm y de proteína de este canal y el tratamiento de estas células con butirato de sodio (NaBu), un inhibidor de acetilasas de histonas, también incrementa el canal aumentando su actividad en un 59%; este tratamiento favorece la NED y la proliferación celular [59]. Con base en estos estudios se ha propuesto a este canal como un posible oncogén y blanco terapéutico para prevenir la NED y el paso a un estadio de independencia de andrógenos.

Contrariamente a lo que se ha visto con el canal Cav3.2, el canal Cav3.1 juega un papel muy diferente en el CP. En células PC-3 el tratamiento con grelina (hormona peptídica multifuncional que juega un papel en la liberación de la hormona del crecimiento, la ingesta de alimentos y la proliferación celular); induce una disminución de la proliferación celular y favorece la apoptosis mediante el aumento tanto de RNAm como de proteína del canal Cav3.1 [60]; esto sugiere que este canal pudiera estar actuando como un gen supresor de tumor.

Las investigaciones que se han hecho sobre los canales tipo-T en CP sugieren que estos se encuentran participando de manera importante en el desarrollo de este cáncer; sin embargo es necesario realizar más estudios para determinar cómo estos canales actúan para evitar o favorecer el desarrollo del cáncer de próstata, con el fin de tener nuevas herramientas terapéuticas más efectivas.

1.2.2. Canales de potasio

1.2.2.1. Características y función de los canales de potasio

El potasio es un catión dominante del medio intracelular y forma parte integral de todas las células. Los canales de potasio representan uno de los grupos más diversos, ya que cuenta con varias clases de canales como: canales dependientes de voltaje (K_v), canales activados por Ca^{2+} (K_{ca}), canales rectificadores (K_{ir}), canales sensibles a ATP (K_{ATP}) y canales con un dominio que contiene dos poros (K_{2p}) [26]. Estos canales de K^+ se encuentran distribuidos en una variedad de tejidos incluyendo células excitables y no excitables, sanas o transformadas. Los canales de potasio no solo proporcionan la salida del flujo de iones K^+ , sino también son importantes reguladores del volumen celular, se encargan de mantener el potencial de membrana debido a que permiten el flujo de salida de potasio intracelular importante para mantener una regulación osmótica y una regulación en el volumen celular en conjunto con intercambiadores de Na^+ y la ATPase Na^+/K^+ . Estos canales están involucrados en mantener el potencial de reposo, la repolarización de la membrana, la osmolaridad y la muerte celular; además contribuyen al potencial de acción nervioso y cardiaco y son clave en la proliferación celular [25].

La actividad de los canales de potasio en la proliferación celular es importante en etapas tempranas del ciclo celular G1 y durante la transición de G1/S y G2; además el potencial de membrana, el volumen celular y el pH sufren también cambios durante la progresión del ciclo celular, siendo los canales de K^+ muy importantes en regular estas funciones. Su papel en el ciclo celular es muy importante ya que se ha visto que el bloqueo de estos canales genera un efecto anti-proliferativo debido a que participan en la hiperpolarización de la membrana que es indispensable para el inicio de la fase G1 del ciclo celular, por lo que el bloqueo de dichos canales genera un arresto en el ciclo celular [25].

Se ha reportado que las células cancerosas generalmente presentan un potencial de membrana menos negativo que el de células normales por lo cual las células cancerosas requieren la expresión de un mayor número de canales de K^+ para generar

una hiperpolarización transitoria de la membrana y así modificarla, la progresión del ciclo celular, el pH y la osmolaridad; así como procesos como proliferación y apoptosis [25, 61, 62].

En cáncer de próstata se ha observado que la expresión de algunos de los canales de potasio se encuentra alterada su expresión por lo que canales como: Kv1.3 (KCNA3) han sido propuestos como biomarcadores, ya que se expresa en estadios tempranos y esta desregulada su expresión en cánceres de alto grado; mientras que los canales BK y BK (L) presentan una expresión independiente de andrógenos y el canal KCa1.1 (KCNMA1) se encuentra expresado en estadios tardíos del cáncer de próstata [25]. Otros canales de potasio también han sido evaluados en etapas de independencia de andrógenos en células LNCaP, donde se ha encontrado que la inhibición de canales de K^+ sensibles a Ca^{2+} (K_{ca}) por verapamilo, tetraetilamonio (TEA) y α -dendrotoxina (DTX), disminuyen la proliferación celular [63, 64], y el uso de agentes que permiten la apertura de canales de K^+ como: minoxidil, 1-Etil-2-benzimidazolinone (EBIO) y diazoxidina facilitan el flujo de iones K^+ causando un aumento en la proliferación de células PC-3 en un 30-50%, demostrando que estos canales tienen un papel importante en la proliferación celular. Por otro lado se ha visto que el tratamiento con amiodarona y glibenclamida generan una inhibición dependiente de la concentración en células sensibles a andrógenos (LNCaP y MDA-PCA-2B) e insensibles a andrógenos (PC-3 y DU-145), y en células PC-3 inducen apoptosis [65]; esto demuestra que los canales de potasio participan de manera importante en la proliferación y apoptosis de células de CP.

1.2.2.2. Características del canal de potasio Eag1.

Entre los canales de potasio que participan de manera importante en el desarrollo del cáncer se encuentran los canales de potasio dependientes de voltaje, en los cuales se encuentra el canal *eter á-go-go* (EAG). Este canal de potasio fue clonado por primera vez de la mosca *Drosophila melanogaster* observando que mutaciones en el locus de *eag* afectaban la excitabilidad celular generando un movimiento agitatorio en las patas

de las moscas durante la anestesia con éter, debido al disparo espontáneo y repetitivo en neuronas motoras y aumento de la liberación de transmisores en la unión neuromuscular. Estudios moleculares del locus de *eag* encontraron que este se divide en tres subfamilias diferentes: *eag*, *erg* (*eag*-related gene) y *elk* (*eag*-like K⁺ channel). Al ser clonados los canales se identificaron: dos miembros para *eag* (*eag1* y *eag2*), tres miembros para *erg* (*erg1*, *erg2* y *erg3*) y tres canales *elk*. El alineamiento de las secuencias de EAG de *Drosophila*, rata, ratón y humano, mostraron que estructuralmente este canal está relacionado a la familia de canales dependientes de voltaje y al igual que otros canales de potasio, su estructura esta forma por tetrámeros ensamblados por cuatro subunidades cada una con 6 segmentos transmembranales putativos (S1-S6) de los cuales el dominio 4 sirve como un sensor de voltaje y un dominio P que es el poro del canal. Tanto el dominio amino como carboxilo terminal se encuentran localizados en la región intracelular; la tetramerización del canal está dada por el dominio C-terminal el cual contiene un dominio de tetramerización coiled-coil (TCC), un dominio de unión a nucleótidos cíclicos (cNBD), así como una señal de localización nuclear (NLS) y un sitio de unión a calmodulina; mientras el dominio N-terminal tiene un sitio PAS (Per-Arnt-Sim) (Fig. 6). La actividad de este canal en mamíferos presenta una activación lenta y permanecen inactivos durante una despolarización sostenida; sin embargo esta activación de los canales es dependiente del potencial [66-68].

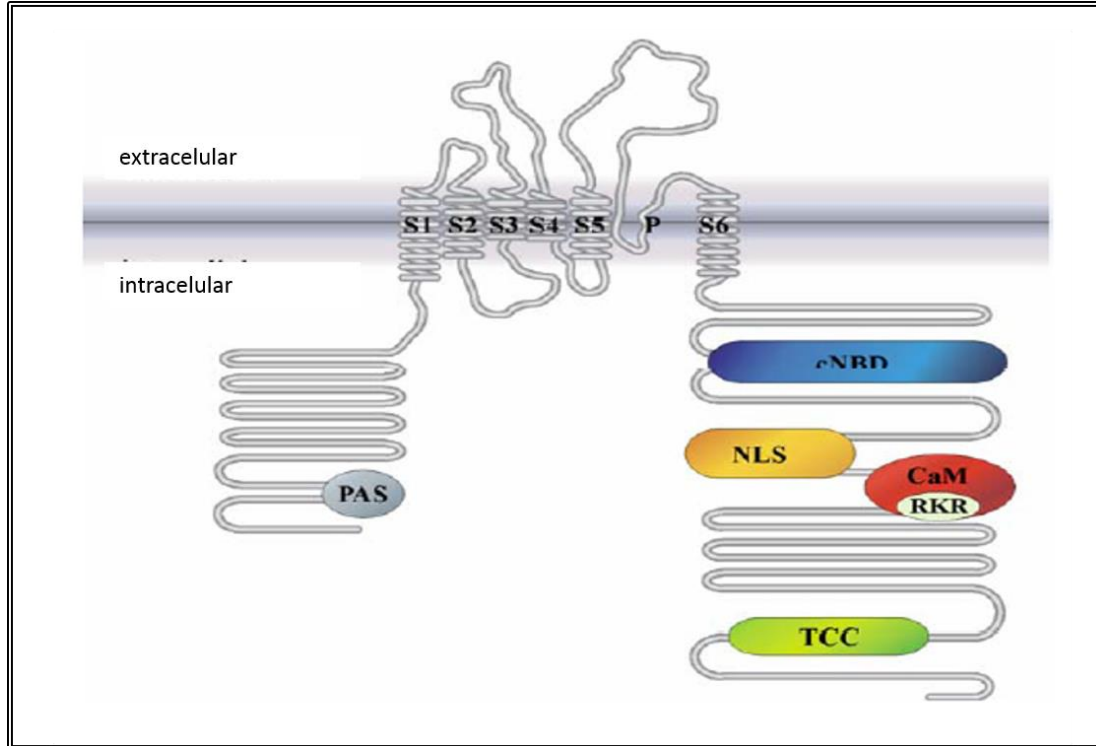


Fig. 6.- Representación esquemática de Eag1. S1-S6 representan los segmentos transmembranales en forma de hélices, P es la región del poro. La región N y C terminal se encuentran localizadas de manera intracelular. Los dominios característicos están representados en elipses de color que son: PAS (PAS Per-Arnt-Sim), cNBD (dominio de unión a nucleótidos cíclicos), NLS (secuencia de localización nuclear), CaM (sitio de unión a calmodulina), RKR (señal de retención del retículo endoplásmico), TCC (dominio de tetramerización coiled-coiled). Tomado y modificado de [67].

En cuanto a la regulación de sus funciones se sabe que hay tres proteínas que se unen a Eag1: epsina, calmodulina y KCR1. En rata se ha demostrado que epsina es una proteína que participa en la endocitosis y se une al canal Eag1 en el dominio carboxilo terminal, alterando tanto la activación como la desactivación de los canales Eag1. La calmodulina (CaM) es una proteína que se une a una secuencia definida del dominio carboxilo terminal de Eag1 e inhibe la corriente de potasio, mientras que KCR1 es otra proteína que también se une al dominio C-terminal de Eag1 en rata pero su función regulatoria aún no es clara; además de estas proteínas que se unen al sitio carboxilo terminal del canal, también existen complejas interacciones entre Eag1 con elementos del citoesqueleto que tienen una fuerte influencia sobre las propiedades del canal. Existen también ciertas modificaciones post-traduccionales como las glicosilaciones (este canal cuenta con seis sitios de glicosilación) que regulan el canal, siendo muy

importantes para modular la función y localización del canal, para su correcto tráfico hacia la membrana plasmática [67-69].

Los primeros indicios de la participación de Eag1 en el ciclo celular se observaron en ovocitos de *Xenopus*, mostrando que las propiedades electrofisiológicas de este canal cambian durante el ciclo celular, ya que se observó que la amplitud de la corriente del canal de Eag1 se reduce cuando se induce con progesterona o el factor promotor de mitosis (MPF) la maduración de los oocitos; con lo cual se sugirió que la regulación de Eag1 en la fase M se debía a re-arreglos del citoesqueleto. Posteriormente se determinó su participación e importancia en la regulación del ciclo celular cuando al ser transfectado el canal en células normales que no lo expresaban, se inducía un fenotipo de transformación de estas células, una mayor proliferación y crecimiento sin inhibición por contacto, en presencia de una baja cantidad de suero [70, 71], lo que ha llevado a sugerir que este canal participa en la transformación de células normales, en el desarrollo del cáncer y en la proliferación.

1.2.2.3. El canal de potasio Eag1 en cáncer

La expresión del canal Eag1 en tejido sano se encuentra regulada y limitada a ciertos tipos de tejidos como cerebro, mioblastos y placenta; pero su expresión puede cambiar expresándose en diferentes tejidos tumorales como: neuroblastoma, mama, glioma, leucemia, melanoma, colon, pulmón, hígado, cervix y ovarios, en varias líneas cancerosas y en biopsias obtenidas de diferentes tipos de neoplasias (Fig. 7); además de encontrarse asociado a diferentes tipos de enfermedades [70, 72].

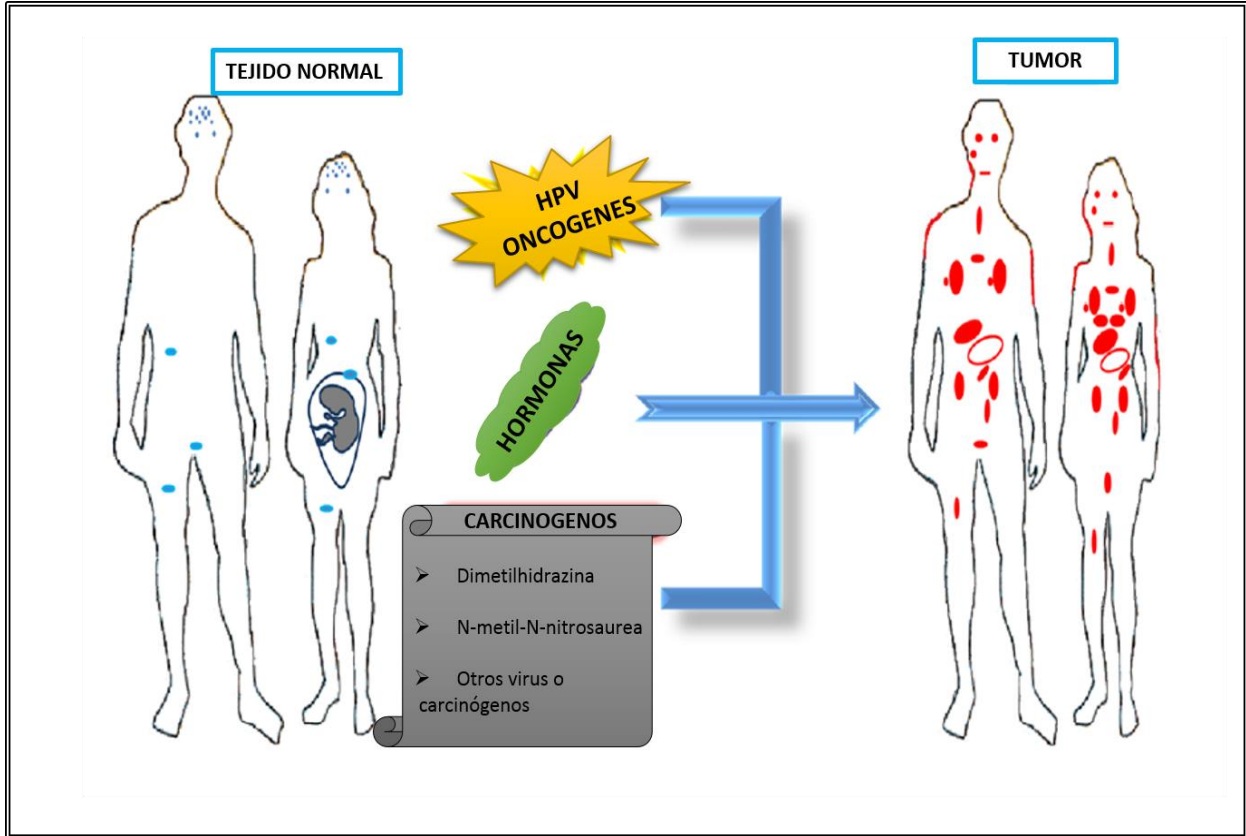


Fig. 7.- Expresión de Eag1. El canal de potasio Eag1 presenta una distribución limitada en tejido normal pero su expresión es abundante en tejido tumoral. La expresión de Eag1 en diversos tejidos se ve regulada por oncogenes, hormonas y carcinógenos que favorecen su expresión en varios tejidos. Tomado y modificado de [70].

En cáncer de cérvix el análisis de la expresión de Eag1 reveló que este canal se expresaba en el 100% de las muestras con cáncer y en el 33% de las muestras normales. La expresión del canal en muestras normales fue analizada, encontrando que algunas de estas muestras tenían la presencia de HPV. En otras muestras se determinó que una provenía de una paciente con tumor de ovario benigno y otra con hiperplasia de endometrio, por lo cual se le propuso a este canal como un marcador potencial en tumores tempranos o de lesiones pre-cancerosas [73]. La expresión de Eag1 no solo se incrementa en cáncer; sino también se ve favorecida su expresión por la presencia de HPV, hormonas y carcinógenos (Fig. 7). En queratinocitos normales; la sola transfección de los oncogenes E6 y E7 de HPV favorece la expresión de RNAm de Eag1 generando un incremento en la proliferación. Por otro lado se ha visto también que el tratamiento

con hormonas regula la expresión de Eag1 ya que el tratamiento hormonal con estradiol favorece en diferentes líneas la expresión o incremento de Eag1 [60]. También las hormonas como los estrógenos tienen un papel importante favoreciendo la expresión de Eag1, ya que en muestras de líneas celulares, queratinocitos normales y citologías cervicales de lesiones intraepiteliales de pacientes que usaron estrógenos, se encontró la expresión de Eag1 en un 70% de las displasias y un 27% en muestras normales; en donde el 50% de los pacientes que consumían estrógenos tenían expresión de Eag1 [74]. En mama también se ha observado que los estrógenos están involucrados en el desarrollo del cáncer así como en la expresión de Eag1; por lo que a Eag1 se le ha propuesto como un marcador de cáncer de cérvix y de mama ya que en estos tipos de tumores los estrógenos juegan un papel importante. La detección de Eag1 en pacientes que consumen estrógenos podría ser un posible marcador de riesgo para desarrollar cáncer.

No solo los virus, hormonas y oncogenes incrementan la expresión del canal; estudios en líneas de cáncer de HCC (hepatocarcinoma celular) y en ratas tratados con el carcinógeno DEN (dietilnitrosamina) para desarrollar HCC, se observó un aumento en la expresión de Eag1. En las líneas celulares con HCC al ser tratadas con astemizol (antihistaminico que actúa como un bloqueador inespecífico del canal de potasio Eag1) se disminuyó la proliferación y la apoptosis; así mismo el tratamiento previo con astemizol en ratas previno la formación de HCC, en aquellas ratas que fueron tratadas con el carcinógeno DEN [75]. En muestras de carcinoma de colon así como en colon de ratones C57BL/6NCrI tratados con los carcinógenos DMH y MNU, se detectó la expresión de Eag1; observándose en los ratones una asociación entre la expresión del canal y el grado de carcinogénesis y supervivencia. En muestras de colon también se observó que el canal no se encuentra expresado en pacientes con colon sano sino únicamente en aquellos que presentan carcinoma o diverticulitis [76].

Se ha determinado también que la sola transfección de Eag1 en células CHO favorece el crecimiento y la proliferación celular, transformando a las células, las cuales al ser transplantadas en ratones inmunosuprimidos se favorece la formación de tumores [71]; mientras que la inhibición del canal con nucleótidos antisentido reducen la síntesis

de DNA. El tratamiento con siRNA para Eag1 en varios tipos de cáncer como carcinoma de mama, melanoma, cérvix y cáncer de cabeza y cuello disminuye la proliferación celular [77, 78]; así como sucede con el tratamiento con diferentes tipos de fármacos, que provoca la disminución del RNAm de Eag1 y la proliferación celular en líneas de cáncer de cérvix y mama [79].

Además de favorecer la proliferación celular e inhibir la apoptosis, se ha determinado también que la implantación de células que expresan Eag1 en ratones inmunosuprimidos favorece la formación de una vascularización excesiva. En células NIH3T3 se observó que la expresión de Eag1 favorece un aumento de la síntesis y secreción de VEGF asociado a un aumento en la actividad transcripcional del factor inducible de hipoxia (HIF-1) [80].

Se ha visto que este el canal Eag1 participa en la migración celular. En células MDA-MB-231 y de cáncer de cabeza y cuello donde se encuentra expresado Eag1, al ser bloqueado con astemizol o siRNA se induce una disminución de la migración en estas células [78, 81]. En cáncer de mama la disminución en la invasión se da a través del control de la entrada de calcio por el canal Orai1 [81]; por lo que este canal representa un potencial blanco para suprimir la migración y prevenir la metástasis de células cancerosas.

Como se ha mostrado las alteraciones en la proliferación, la apoptosis y la inducción de la metástasis en cáncer están muy relacionadas con la des-regulación del canal Eag1; sin embargo aún se conoce poco sobre los mecanismos de regulación de este canal. Se ha propuesto que una de la vías que regula y favorecen la expresión de este canal es a través de E2F ya que en células de cáncer de colon este factor E2F favorece su expresión; mientras que la represión de E2F por activación de p53 en situaciones de estrés incrementa a el micro RNA-34 que a su vez disminuye a E2F y la transcripción de Eag1, disminuyendo así la proliferación celular o generando un arresto en el ciclo celular [82]. En líneas de cáncer de mama MCF-7 también se ha observado una regulación de este canal por parte de IGF-1, el cual favorece la expresión y actividad del canal a través de la vía AKT [83]. En osteosarcoma en la línea MG-63 al inhibir p38

MAPK con el inhibidor SB203580 o siRNA se reducen los niveles de proteína de Eag1 incrementado los niveles de p53; así mismo la activación de p53 provoca un arresto del ciclo celular y una disminución del nivel de proteína de Eag1; mientras que la inactivación de p53 promueve el crecimiento celular y un aumento de la proteína de Eag1 [84]. Esto podría indicar al igual que en otros reportes que p53 participa en la regulación del canal Eag1, ya sea de manera indirecta o directa; por lo que algunos tipos de cánceres que no expresan o tienen mutado p53 pudieran estar expresando Eag1 en mayor proporción favoreciendo el desarrollo del cáncer.

Ya que se ha encontrado a este canal en diversos tipos de cánceres favoreciendo la transformación, crecimiento, proliferación celular, migración e inhibición de la apoptosis, se han buscado diferentes formas de disminuir la expresión y el efecto generados por el canal Eag1; probado la inhibición del canal con oligonucleótidos antisentido observando que esta reduce la síntesis de DNA [71], mientras que el tratamiento con siRNA para Eag1 en varios tipos de cáncer como carcinoma de mama, colon, melanoma, cérvix y neuroblastoma disminuye la proliferación celular [77]. También se ha buscado un tratamiento mediante fármacos que bloquean el canal y disminuya su expresión observando que el tratamiento con diferentes tipos de fármacos como el astemizol y la imipramida disminuye el RNAm de Eag1, así como la proliferación celular de líneas de cáncer de cérvix y mama. Ambos fármacos se unen de manera selectiva al canal abierto con una distinta afinidad. La imipramida bloquea al canal de manera corriente dependiente; mientras que el bloqueo con astemizol es voltaje dependiente; sin embargo ambos logran disminuir en diferente grado la proliferación celular. En líneas de cáncer de mama el bloqueo con astemizol disminuye de manera eficiente la proliferación celular y la expresión de Eag1; mientras que en líneas de cérvix el tratamiento con imipramida y astemizol promueve la apoptosis [85-87]. Debido al bloqueo que tienen estos fármacos sobre Eag1 estos han sido propuestos para un nuevo uso con fines terapéuticos en cáncer.

También se ha demostrado en líneas de cáncer de mama y cérvix que otros compuestos con potencial antitumoral como el calcitriol, posee efectos en la disminución

de la expresión del RNAm de Eag1, favoreciendo así una disminución de la proliferación celular. Se ha determinado en cáncer de mama que el efecto del calcitriol se puede potenciar obteniendo mejores resultados cuando se combina con el astemizol ya que este reprime la expresión de CYP24A1 una enzima que se encarga de degradar el calcitriol, mientras que aumenta la disponibilidad del receptor de la vitamina D (VDR) al cual se une el calcitriol para ejercer sus efectos anti-proliferativos. Se ha observado que el uso del calcitriol y el astemizol solos o en combinación son capaces de disminuir el tamaño de los tumores generados en ratones inmunosuprimidos con xenotransplantes de células T-47D y cultivos primarios de cáncer de mama [79, 85, 88]. Gracias a los efectos que se han observado de varios fármacos sobre Eag1 estos podrían ser empleados para el tratamiento de diversos tipos de cáncer donde Eag1 se encuentre sobre-expresado; ya que se ha demostrado que este canal puede ser empleado como un blanco terapéutico en cáncer. La inhibición inespecífica del canal mediante compuestos anti-neoplásicos como el calcitriol, ofrece una herramienta terapéutica para aquellos cánceres con presencia de Eag1, proporcionando información que permita diseñar nuevos fármacos contra el cáncer dirigidos de manera específica al canal de potasio Eag1; por esto y debido a su distribución restringida en tejido no tumoral, su papel en proliferación, apoptosis y migración; así como su asociación con un pobre diagnóstico, el canal de potasio Eag1 ha tomado gran importancia en el desarrollo del cáncer; siendo sugerido como un marcador cancerosos, un potencial marcador temprano y un posible blanco terapéutico.

1.2.2.4. El canal de potasio Eag1 en cáncer de próstata

La expresión del canal Eag1 se ha encontrado alterada en varios tipos de cáncer y se ha visto altamente relacionado con la proliferación celular en cáncer, ya que su inhibición genera una disminución en la proliferación. En próstata se ha estudiado muy poco su expresión y posible función en este tipo de cáncer, sin embargo ya se ha detectado su expresión en muestras de carcinoma de próstata; algunos estudios

muestran que en tejido sano de próstata Eag1 tiene una expresión del 6-7%; pero en tejido de cáncer primario de próstata se encuentra una expresión abundante del canal, la cual incrementa en un 86-88% en este cáncer [26, 89, 90], por lo cual este canal pudiera ser usado para el diagnóstico de la enfermedad y como posible blanco terapéutico.

En líneas celulares de cáncer de próstata, solo se ha visto su expresión en la línea DU-145 que es independiente de andrógenos; mientras que en la línea LNCaP dependiente de andrógenos y PC-3 su expresión es nula. En la línea DU-145 que expresa el canal Eag1 se probó un posible tratamiento formado por un anticuerpo que reconoce a Eag1 unido al dominio TRAIL el cual favorece la inducción de la apoptosis en células que expresan Eag1. Esta construcción es capaz de dirigirse únicamente a las células cancerosas induciendo en estas células la apoptosis. Esta fusión en conjunto con fármacos como el astemizol, etopósido y ciclohexamida podrían favorecer la disminución del RNAm de Eag1, por lo tanto disminuir la proliferación e inducir la apoptosis.

Las diferencias en la expresión de Eag1 en las líneas celulares de cáncer de próstata han permitido diseñar una terapia dirigida mediante anticuerpos que reconocen la región del poro de Eag1 mediante el uso de una proteína de fusión sTRAIL en combinación con un tratamiento citotóxico favoreciendo así la apoptosis; lo que sugiere que el uso de anticuerpos para dirigir drogas a moléculas que expresan el canal Eag1 permitiría crear una terapia dirigida a aquellas células que expresan Eag1; proponiendo por primera vez en cáncer de próstata al canal Eag1 como un posible blanco terapéutico [91].

Aunque no se han estudiado a fondo los posibles efectos de la expresión del canal Eag1 en CP, se ha visto que este canal se sobre-expresa altamente en este cáncer; por lo que este pudiera tener un papel importante en su desarrollo. Los estudios en diferentes cánceres demuestran que este canal en CP pudiera ser un potencial blanco terapéutico; sin embargo es necesario estudiar más los mecanismos que están involucrados en la regulación de Eag1 con el fin de buscar posibles fármacos que tengan como blanco a Eag1 para que estos puedan ser empleados como una nueva herramienta terapéutica para pacientes con CP.

2. Justificación

El cáncer de próstata es una de las causas más frecuentes de muerte en hombres mayores de 65 años; la falta de tratamientos efectivos, ha llevado a buscar nuevos posibles blancos terapéuticos como los canales iónicos, debido a que tienen un papel muy importante dentro de diversos procesos celulares como proliferación, apoptosis y diferenciación, entre otros; por lo que la desregulación en la expresión de estos canales puede llevar al desarrollo de diversos tipos de cánceres. Algunos canales como los canales de calcio tipo-T y el canal de potasio Eag1 se han relacionado con el desarrollo del cáncer, ya que participa en procesos importantes como ciclo celular, invasión, apoptosis y diferenciación. Por otro lado el astemizol un antihistaminico que bloquea de manera inespecífica el canal Eag1, ha demostrado tener efectos anti-proliferativos y pro-apoptoticos en células que expresan el canal Eag1. En cáncer de próstata, se conoce poco sobre la participación de estos canales y si estos son importantes en el desarrollo de este cáncer; así mismo se desconoce si el astemizol podría tener efectos terapéuticos en el CP; es por ello que es de nuestro interés estudiar estos canales en este tipo de cáncer con el fin de determinar si estos favorecen su desarrollo participando en procesos como proliferación, apoptosis e invasión, con el fin de ser propuestos como posible blancos terapéuticos, así como determinar los efectos del astemizol en la apoptosis y proliferación debido al bloqueo de Eag1; ya que las terapias existentes en la actualidad para este cáncer no son muy efectivas.

3. Hipótesis

Los canales de calcio tipo-T (Cav3.1 y Cav3.2) y Eag1 se expresan de manera diferencial en las líneas celulares RWPE1 (poco invasiva) y NB26 (muy invasiva) y el bloqueo de Eag1 con astemizol producirá una disminución en la proliferación celular e inducirá un aumento en la apoptosis.

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

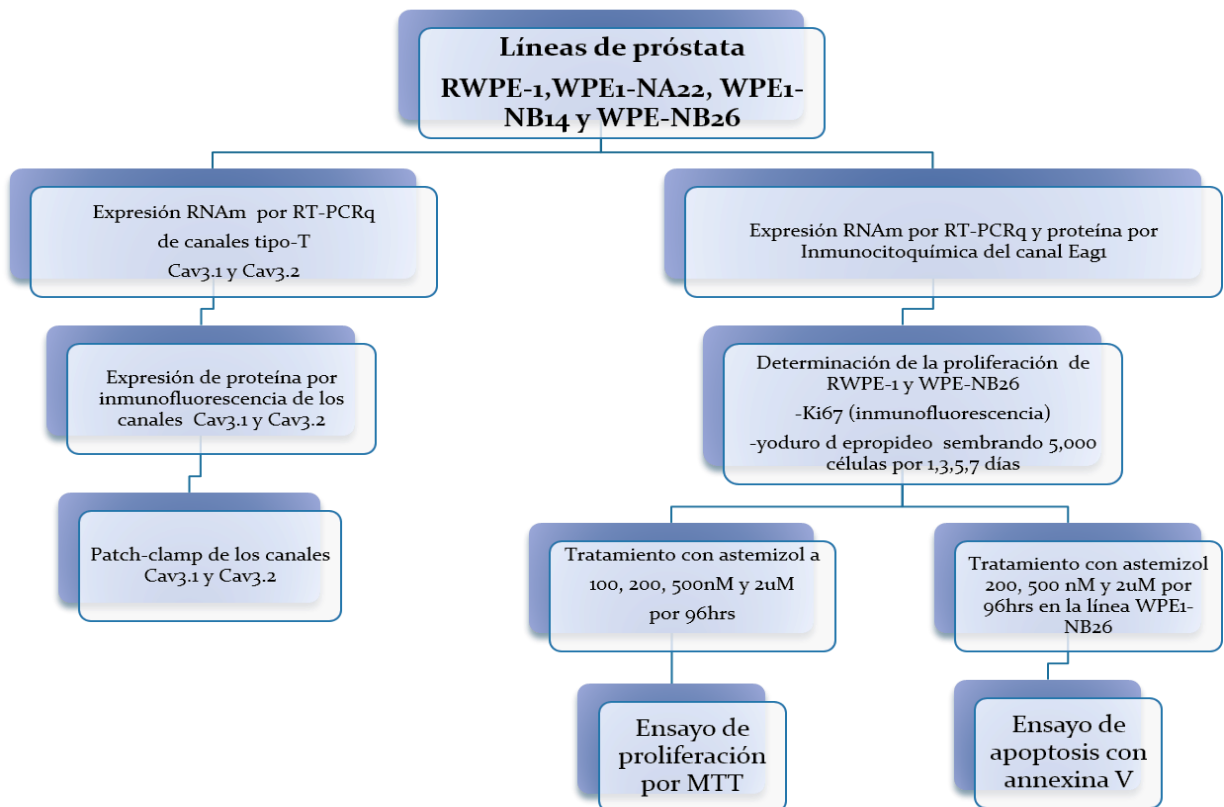
Evaluar la expresión de los canales de calcio tipo-T (Cav3.1 y Cav3.2) y EAG1 en las líneas RWPE1 (poco invasiva) y NB26 (muy invasiva) y el efecto del bloqueo de EAG1 con astemizol en la proliferación celular y la apoptosis de estas líneas celulares.

4.2. Objetivos Particulares

- Evaluar el nivel de mRNA de los canales tipo-T (Cav3.1 y Cav3.2) por qPCR en líneas celulares derivadas de próstata: RWPE1, WPE1-NA22, WPE1-NB14 y WPE1-NB26.
- Evaluar la expresión proteica de los canales tipo-T (Cav3.1 y Cav3.2) por inmunofluorescencia en las líneas celulares derivadas de próstata RWPE1 y WPE1-NB26.
- Evaluar la actividad de los canales tipo-T (Cav3.1 y Cav3.2) por la técnica de Patch-clamp en las líneas celulares derivadas de próstata: RWPE1 y WPE1-NB26.
- Evaluar el nivel de mRNA de Eag1 por qPCR en líneas celulares derivadas de próstata: RWPE1 y WPE-1 NB26.

- Evaluar la expresión de la proteína Eag1 por inmunocitoquímica en las líneas celulares derivadas de próstata RWPE1 y WPE-1 NB26.
- Evaluar la tasa de proliferación celular de las líneas RWPE1 y NB26 mediante la expresión de ki67 y por el ensayo de Azul Alamar.
- Evaluar el efecto del astemizol sobre la proliferación en las líneas RWPE1 y NB26 por el ensayo de MTT.
- Determinar el efecto del astemizol sobre la apoptosis en las líneas RWPE1 y NB26 mediante el ensayo de anexina V.

5. Estrategia Experimental



6. Materiales y Métodos

6.1. Materiales.

Trizol, DMSO, camfotecina, DAPI y astemizol de (Sigma-Aldrich St. Louis, E.E.U.U.). Anticuerpo policlonal anti-Eag1, anti-Cav3.1 policlonal (Novus Biologicals), anti-Cav3.2 monoclonal de (Novus Biologicals), anti-Ki67 policlonal FITC (Abcam), anticuerpo secundario anti-IgG conejo conjugado a FITC (Novus Biological), anti-IgG conejo conjugado a FITC (Jackson ImmunoResearch) y vectashield (Vector Laboratories). Taq DNA-polimerasa de New England BioLabs (E.E.U.U.) y TaqMan Universal Master Mix de Biosystems by Life Technologies (USA). Dead Cell Apoptosis Kit con Annexin V Alexa Fluor™ 488 (Thermo Fisher Scientific E.E.U.U.)

6.2. Líneas celulares.

Las líneas de próstata RWPE-1, WPE1-NA14, WPE1-NA22 y WPE1-NB26 fueron obtenidas del American type Culture Collection (Manassas, E.E.U.U.). Las células se crecieron en medio KSFM (Keratinocyte serum-free medium de Gibco) suplementado con BPE 50µg/ml, EGF 5ng/ml (Gibco by Life Technologies) y antibiótico/antimicótico 1%. Para el tratamiento con astemizol las líneas RWPE-1 y WPE1-NB26 fueron crecidas por 72 hrs con medio KSFM, posteriormente el medio fue removido y las células fueron tratadas por 96hrs con medio fresco que contenía DMSO (vehículo) o diferentes concentraciones de astemizol. Las siguientes líneas celulares fueron utilizadas como controles HEK-293, HEK3.1, HEK-3.2, HEK-3.3 CHO WT y CHO PT. Estas líneas fueron cultivadas de acuerdo a las instrucciones del ATCC para cada una de ellas. Todas las células fueron incubadas a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂.

6.3. Expresión génica.

El RNA total fue extraído de las líneas celulares RWPE-1, WPE1-NA14, WPE1-NA22 y WPE1-NB26 con Trizol. El cDNA fue obtenido a partir de 5 µg de RNA tratados con DNAsa I y con la transcriptasa reversa M-MULV (New England Biolabs, Ipswich, MA, E.E.U.U.). El ensayo de PCR-tiempo real fue realizado usando las siguientes sondas TaqMan: HPRT Ref. 4326321E (Pre-Development TaqMan assay Reagents Applied Biosystems by Life Technologies) Cav3.1 HS00367969-M1, Cav3.2 HS00234934-M1 y Eag1 HS00924320-M1 (TaqMan gene expression assays, Life Technologies). Los genes HPRT, Cav3.1, Cav3.2 y Eag1 fueron amplificados usando PCR Master mix (Applied Biosystems, Life Technologies, E.E.U.U.) y el equipo One Step Real-Time PCR system (Applied Biosystems by Life Technologies, E.E.U.U.) siguiendo las condiciones de temperatura recomendadas. Los niveles de expresión de Cav3.1, Cav3.2 y Eag1 fueron normalizados con el gen constitutivo HPRT y los resultados fueron analizados por una cuantificación relativa usando el método de doble delta Ct ($\Delta\Delta Ct$).

6.4. Inmunofluorescencia

Las líneas celulares RWPE1 y WPE1-NB26 se crecieron en cubreobjetos con medio KSFM, luego se lavaron 2 veces con PBS y fijaron con paraformaldehído al 4%. Las células fijadas se lavaron 2 veces con PBS y fueron permeabilizadas con triton al 0.2% por 10 minutos, después se lavaron 2 veces con PBS y posteriormente se bloquearon con gelatina al 3% por 30 minutos para después lavar los cubresobjetos 2 veces con PBS. Posteriormente se incubaron los cubreobjetos toda la noche en cámara húmeda a -4°C con el anticuerpo primario Cav3.1 a una dilución 1:200 (Novus International) y Cav3.2 a una dilución 1:250 (Novus International) y Ki67 a una dilución 1:500 (Abcam). Posteriormente los cubreobjetos fueron lavados 2 veces con PBS/Tween al 1% por 15 minutos y luego con PBS por 5 minutos para después incubar los cubreobjetos con los anticuerpos secundarios por 1 hora con anti-IgG ratón a una dilución 1:100 (FITC Novus

International) y anti-IgG conejo a una dilución 1:100 (FITC Jackson ImmunoResearch) en cámara húmeda; después del marcaje con el anticuerpo secundario, los cubreobjetos fueron lavados 2 veces con PBS/Tween al 1% por 15 minutos y luego con PBS por 5 minutos. La tinción fue completada al marcar las células con DAPI a una dilución 1:700 por 10 minutos (Sigma-aldrich) seguida de 10 lavados con agua MiliQ y 10 lavados con PBS. Los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos con vectashield (Vector Laboratories) y la observación fue realizada en un microscopio confocal (CLSM; TCP-SP5, Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania). Las líneas celulares HEK-293, HEK3.1 y HEK3.2 fueron usadas como controles positivos y negativos de la expresión de Cav3.1 y Cav3.2.

6.5. Patch Clamp

Los experimentos de electrofisiología fueron realizados utilizando la técnica de fijación de voltaje en parches de membrana (patch-clamp). Para determinar las corrientes de calcio de los canales tipo-T, las células HEK-3.3. (control positivo), RWPE-1 y WPE1-NB26 fueron sembradas en cubreobjetos de 5mm x 5mm por 2 horas; posteriormente los cubreobjetos se colocaron en el equipo de patch-clamp. Para llevar a cabo el ensayo se usaron capilares de borosilicato con un diámetro en la punta de 1 micrómetro y una resistencia interna de 2.5-5 MΩ. y se emplearon dos soluciones una para determinar la activación de canales tipo-T (Cav3.1, Cav3.2 y Cav3.3) y otras para la activación de canales en general (calcio, cloro, potasio y sodio). Los experimentos fueron realizados utilizando una configuración de célula completa (whole-cell).

En la tabla 1 se muestran las composiciones de las soluciones externas con las que se perfundieron las células y las soluciones internas de sellado de la micropipeta.

Tabla 1. Composición de soluciones internas y externas usadas en el ensayo patch-clamp

SOLUCIONES PARA CANALES DE CALCIO TIPO-T	
Solución externa	Solución interna
TEA-Cl 160mM CaCl ₂ 5mM HEPES 10mM 307 mOSm	CsCl 135mM CaCl ₂ 2mM MgCl ₂ 1mM EGTA 10mM HEPES 10mM GTP y ATP
pH 7.4	pH7.3
SOLUCIONES PARA CANALES IONICOS	
Solución externa	Solución interna
KCl 5mM NaCl 156mM CaCl ₂ 2mM MgCl ₂ 1mM 10 HEPES 10mM 310 mOSm	KCl 126mM NaCl 30mM CaCl ₂ 2mM MgCl ₂ 1mM 310 mOSm
pH 7.4	pH7.3

Para los ensayos de Patch-clamp se usaron dos protocolos:

***IV -500:** Este protocolo consiste en dar pulsos desde -80mV y hasta +80mV en incrementos de -10mV con una frecuencia de 0.1 Hz, con lo que posteriormente se hizo una curva corriente-voltaje.

***sp 30150:** Se da un pulso único a -30mV de 100ms cada 10s alcanzando su valor máximo la corriente de calcio (I_{ca}) alrededor de -30mV.

Para el registro de las corrientes iónicas, las células se colocaron en una cámara de 0.5 ml montada sobre la platina de un microscopio y posteriormente se perfundieron con la solución externa a una velocidad de 1 ml/min. Las corrientes se registraron a temperatura ambiente (21-23° C) usando un amplificador Axopatch 200B amplifier, un convertidor Digital 1320A/D y el software pCLAMP 10.4 (Molecular Devices, Sunnyvale, E.E.U.U.).

Para el análisis de la corriente de calcio en las líneas celulares de próstata y la línea control (HEK11), se aplicó el protocolo sp 30150 para la línea control HEK-11 con un HP de -100mV con un pulso despolarizante de -30mV de 100ms. También se aplicó a la línea control un protocolo IV -500 con el cual se observa la relación corriente voltaje, aplicando pulsos despolarizantes de 100ms y finalmente se aplicó un protocolo para la apertura de canales en general usando el protocolo de IV -500. Para obtener los valores de los picos de corriente, las lecturas realizadas se analizaron en el software Clampfit 10.4.

6.6. Inmunocitoquímica.

Las líneas celulares RWPE1 y WPE1-NB26 se crecieron en laminillas con medio KSFM, luego fueron fijadas con etanol al 96%. Las laminillas fueron puesta calentar a 100°C por 10 minutos en recuperación antigénica, posteriormente se trataron con un bloqueador de peroxidasa endógena (Bio SB, Santa Barbara, E.E.U.U.) por 10 minutos y luego se incubaron toda la noche con el anticuerpo policlonal anti-Eag1 (Novus International) a una dilución 1:500 a -4°C. Posteriormente las laminillas fueron incubadas con el anticuerpo secundario biotinilado (Bio SB) por 15 minutos y luego se incubaron con estreptavidina (Bio SB) por 15 minutos. La tinción fue completada añadiendo diaminobenzidina (Bio SB). Las laminillas fueron contra-teñidas con hematoxilina y fueron observadas en un microscopio Olympus IX51. Las líneas celulares CHO-WT y CHO-Pt fueron usadas como controles positivos y negativos de la expresión de Eag1.

6.7. Tasa de proliferación

Para la curva de proliferación se sembraron 5,000 células en placas de 24 pozos por 24, 48, 96, 144 y 192 horas. Posteriormente se determinó el número de células vivas mediante la técnica metabólica de Alamar blue; para esto se aspiró el medio de las células, se lavó con PBS y se le adiciono medio mínimo, posteriormente se añadieron 10ul del reactivo alamar blue y se dejó incubando de 1-4hrs. a 37°C; pasado el tiempo de incubación se leyó la fluorescencia con la cual se determinó el número de células vivas.

6.8. Ensayo de Proliferación

La proliferación celular en presencia de astemizol fue estudiada sembrando 5,000 células en placas de 24 pozos, las cuales se incubaron por 72 horas; después de este tiempo se cambió el medio y las células fueron cultivadas en medio fresco sin astemizol, en medio con astemizol a concentraciones de 100, 200, 500nM y 2µM o medio con DMSO (vehículo) por 96 horas. Posteriormente se determinó el número de células vivas con cada tratamiento mediante la técnica de reducción metabólica por MTT; posteriormente el número de células vivas se determinó por la cuantificación de las sales de formazan formadas, mediante la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450nm en el Multieskan Go (Thermo Scientific).

6.9. Apoptosis

Se sembraron 60,000 células y se incubaron por 72 horas; después de este tiempo el medio se cambió y las células fueron cultivadas con medio fresco solo, medio con

astemizol (500nM y 2µM) o DMSO (vehículo) por 96 horas. Como control positivo se usó Camptotecina 4µg/ml (inductor de apoptosis) y 100µL de etanol (inductor de necrosis); los cuales fueron añadidos 24 horas después del tratamiento. Después de 94h con tratamiento las células fueron tripzinizadas y centrifugadas junto con su sobrenadante por 15 minutos a 1000 rpm; posteriormente la apoptosis fue medida usando el kit de apoptosis con anexina V alexa fluor 488 y Ioduro de propidio (PI) (Thermo Fisher scientific), siguiendo las instrucciones del kit. La apoptosis fue determinada usando el citómetro de flujo Cyan DakoCytomation (Dako, Glostrup, Dinamarca). El análisis se realizó de la siguiente manera: células viables (FITC y PI negativos), apoptosis (FITC positivo y PI negativo) y apoptosis tardía (FITC y PI positivos) el cual se hizo para todos los grupos usando el software Summit 5.

6.10. Análisis estadístico.

Todos los valores fueron reportados como la media \pm SD de tres experimentos independientes. El método estadístico de análisis usado para comparar las diferencias entre grupos fue la prueba de Sidak. Valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. El análisis se hizo usando el software GraphPad Prism version 6.

7. RESULTADOS

En este proyecto se pretendió determinar la viabilidad del uso de diferentes canales iónicos, como los canales tipo-T (Cav3.1 y Cav3.2) y Eag1, como potenciales blancos terapéuticos. La expresión de estos canales iónicos ha sido reportada en células provenientes de diversos tipos de tumores, por lo que es importante conocer sus niveles de RNAm y de proteína tanto en tejido prostático normal, como en tejido canceroso prostático de diferente grado y en líneas celulares derivadas de ellos. Aunque existe una variedad de líneas celulares utilizadas comúnmente para el estudio del cáncer de próstata, para este proyecto decidimos utilizar una serie de líneas celulares que representan un modelo que asemeja algunas de las diferentes etapas de este tipo de cáncer, para así determinar en ellas, si estos canales (tipo-T y Eag1) pueden ser potenciales blancos terapéuticos del cáncer de próstata. Esta serie de líneas celulares está formada por las líneas: RWPE-1, WPE1-NA14, WPE1-NA22 y WPE1-NB26, las cuales comparten el mismo linaje y asemejan las etapas de progresión y carcinogénesis del cáncer de próstata, desde la neoplasia intraepitelial prostática (PIN), hasta la invasión y progresión [92].

La línea RWPE-1, obtenida a partir de células tomadas de tejido prostático sano (no-canceroso) e inmortalizadas con el genoma de HPV-18, presenta características típicas de células epiteliales sanas, con forma ovalada y citoplasma poco abundante (Fig. 8 A); esta línea no presenta características tumorigénicas ni de invasividad y se asemeja a células epiteliales prostáticas normales. A partir de esta, se originaron otras líneas celulares que presenta cambios progresivos desde las etapas de pre-neoplasia y no invasividad, hasta llegar a células carcinogénicas altamente invasivas, imitando así diferentes estadios de progresión que ocurren en el desarrollo del cáncer de próstata. Las otras líneas de este modelo fueron obtenidas mediante el tratamiento de las células RWPE-1 con N-metil-N-nitrosourea (MNU) generando las líneas: WPE1-NA22, que presenta algunas características similares a las de las células RWPE1, aunque con

morfología ligeramente más alargada, y con baja capacidad tumorigénica e invasiva (Fig. 8 B); la línea WPE1-NB14 que es considerada intermedia y que presenta una morfología con mayor alargamiento y con capacidad invasiva media (Fig. 8 C); y finalmente la línea WPE1-NB26 cuyas células tienen una morfología totalmente alargada y con citoplasma más abundante (Fig. 8 D), representando la última etapa del cáncer de próstata, con crecimiento rápido y siendo altamente tumorigénicas e invasivas.

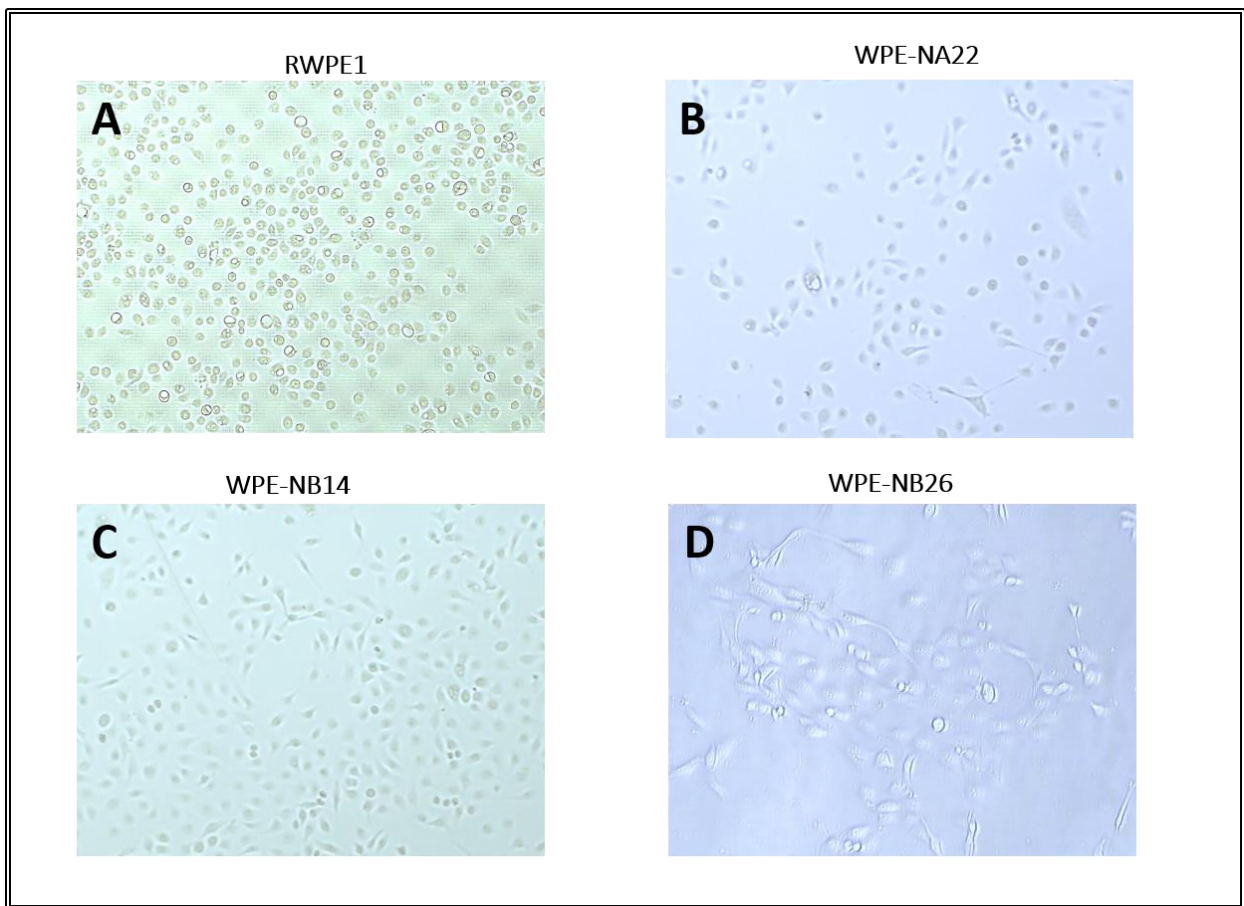


Fig. 8.- Líneas celulares de próstata. Morfología y apariencia de las líneas celulares de próstata usadas. A) línea RWPE1 células con morfología de células epiteliales con forma ovalada y citoplasma escaso B) La línea celular WPE1-NA22 presenta una morfología ligeramente alargada y citoplasma poco abundante. C) La línea WPE1-NB14 presenta una morfología alargada y citoplasma abundante. D) línea WPE-NB26 con morfología muy alargada similar a husos y citoplasma muy abundante. Todas las fotos fueron tomadas con un microscopio Olympus IX51 a 20X.

7.1. Análisis de la expresión de los canales de calcio tipo-T en líneas de próstata.

En cáncer de próstata aún no es claro el papel que podrían desempeñar los canales iónicos tipo-T, por lo que fue de nuestro interés primeramente determinar el perfil de expresión de los canales Cav3.1 y Cav3.2 en el modelo de líneas celulares RWPE-1, WPE1-NA14, WPE1-NA22 y WPE1-NB26.

Para determinar el nivel de expresión de los canales tipo-T, en primer lugar se evaluaron los niveles de RNAm mediante RT-qPCR. Para el canal Cav3.1, se observó que el nivel de RNAm fue significativamente más elevado en la línea RWPE-1, mientras que en las líneas consideradas intermedias WPE1-NA14 y WPE1-NA22, el nivel de RNAm fue muy similar entre ellas teniendo una expresión significativa del 30 al 40%. El nivel de RNAm de este canal iónico en la línea más agresiva WPE1-NB26, fue significativamente mayor que el observado en las líneas intermedias, pero 50% menos que en la línea menos agresiva RWPE1 (Fig. 9 A).

En cuanto al canal Cav3.2, se observó que a nivel de RNAm la línea RWPE1 era la única línea que expresaba el canal (Fig. 9 B); ya que en ninguna de las otras líneas celulares WPE1-NA14, WPE1-NA22 y WPE1-NB26 fue posible detectar su expresión. La expresión de ambos canales en la línea RWPE1 y su pérdida o drástica disminución en las WPE1-NA14, WPE1-NA22 y WPE1-NB26 sugiere que dichos canales podrían jugar un papel regulatorio importante en el desarrollo del cáncer de próstata, ya que en etapas en las que las células comienzan a presentar características cancerosas, la expresión del canal Cav3.2 desaparece o disminuye, muy posiblemente debido a la metilación del gen; mientras que en el caso del canal Cav3.1 la disminución en su expresión es menos marcada.

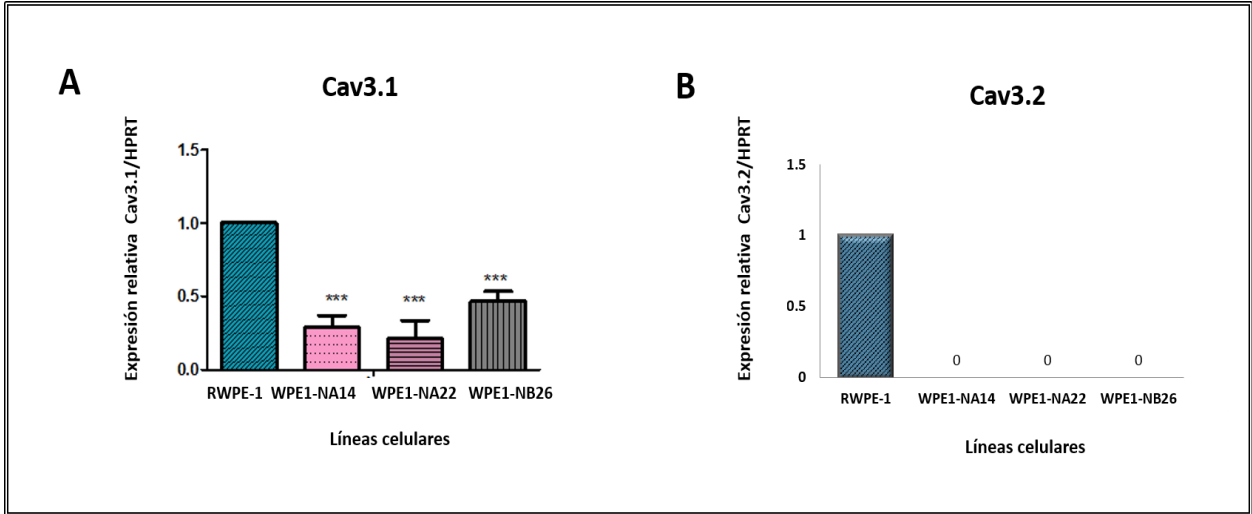


Fig. 9.- Niveles de RNAm de los canales de calcio tipo-T detectados en las líneas de próstata. Los niveles de RNAm de Cav3.1 y Cav3.2 fueron evaluados mediante RT-PCRq en las líneas de próstata RWPE-1 WPE1-NA14, WPE1NA22 y WPE1-NB26. A) Nivel de RNAm del gen Cav3.1 en las líneas celulares. B) Nivel de RNAm del gen Cav3.2 en las líneas celulares. La expresión relativa de los niveles de RNAm se obtuvieron mediante normalización con el RNAm de HPRT. La expresión relativa de Cav3.1 y Cav3.2 es el resultado de la media \pm SD de n=3, *** $P < 0.0001$ vs RWPE1.

Al observar que de manera general, las diferencias en la expresión de RNAm de ambos canales en las líneas WPE1-NA14, WPE1-NA22 y WPE1-NB26 era mínimas y que los cambios en las líneas intermedias (WPE1-NA14, WPE1-NA22) no eran tan marcados en relación con la línea considerada más invasiva (WPE1-NB26), se decidió continuar el desarrollo del proyecto enfocados en el análisis comparativo entre la línea de células no cancerosas e inmortalizadas (RWPE-1) y la línea de células cancerosas con alta capacidad invasiva (WPE-NB 26). Con el fin de determinar si los niveles de RNAm de los canales Cav3.1 y Cav3.2 se ven reflejados en sus niveles proteicos, se realizó su detección mediante inmunofluorescencia (IF), usando como controles a la línea HEK-293, que no expresa ninguno de estos canales; a HEK-3.1, que expresa establemente a Cav3.1 y a HEK-3.2, que expresa establemente a Cav3.2.

Una vez estandarizada la técnica con los controles correspondientes así como con el control de anticuerpo secundario, se realizó el ensayo de IF para las líneas de interés, observando (Fig. 10 A) que a nivel proteico, el canal Cav3.1 únicamente se detecta en la

línea WPE1-NB26 y en muy baja cantidad, mostrando una localización sub-celular tanto en membrana como en citoplasma. Esta localización coincide con la observada en las células HEK-3.1 utilizadas como control positivo, pero con mayor expresión. Para el canal Cav3.2 (Fig. 10 B), también se detectó la proteína únicamente en la línea RWPE1, pero su nivel fue todavía más bajo (apenas detectable), presentando una localización tanto en citoplasma como en núcleo. De manera muy similar a lo observado para el canal 3.1, esta localización coincide con la observada en las células HEK-3.2 utilizadas como control positivo, pero con una mucha mayor expresión.

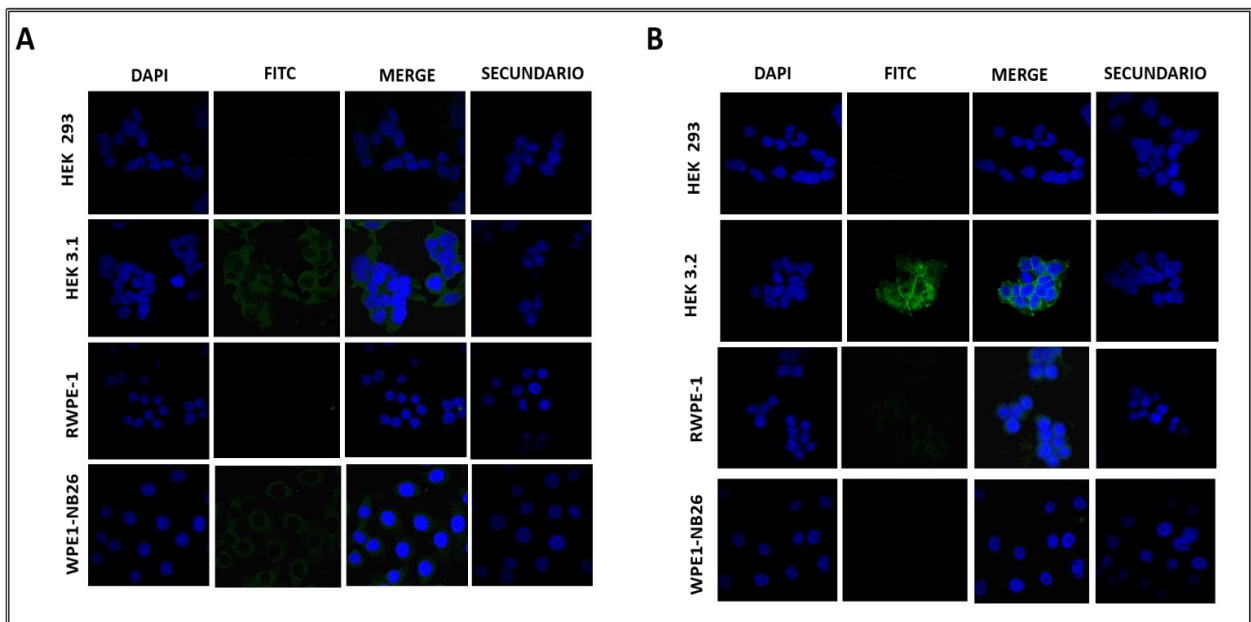


Fig. 10.- Detección mediante Inmunofluorescencia (IF) de las proteínas Cav3.1 y Cav3.2 en líneas celulares derivadas de próstata. Expresión de proteína en las líneas RWPE1 y WPE1-NB26 A) IF del canal Cav3.1 en la línea HEK-293 (negativa a ambos canales), HEK-3.1 (positiva a Cav3.1) y líneas de próstata (RWPE1 y WPE1-NB26). B) IF del canal Cav3.2 en la línea HEK-293 (negativa a ambos canales), HEK-3.2 (positiva a Cav3.2) y líneas de próstata (RWPE1 y WPE1-NB26).

La observación del bajo nivel de proteína de ambos canales detectado en las líneas de próstata, nos hizo pensar en que su participación en el desarrollo de esta enfermedad solo pudiera asociarse con una funcionalidad muy elevada, por lo que se decidió determinar si estos canales se encontraban activos tanto en la línea RWPE-1 como en la línea WPE1-NB26.

7.2. Determinación de la actividad de los canales de calcio tipo-T en las líneas RWPE1 y WPE1-NB26.

Para estudiar la funcionalidad de los canales Cav3.1 y Cav3.2 en las líneas RWPE-1 y WPE-NB26, se realizó la técnica comúnmente usada en electrofisiología conocida como Patch-clamp. Para evaluar la actividad de ambos canales se aplicó un potencial de membrana (HP) de -100mV, tanto en las células RWPE1 como en las WPE-1 NB26, utilizando como control positivo a la línea HEK-3.3 (que expresa establemente el canal tipo-T Cav3.3). Esta línea celular representa un control positivo conveniente, ya que el canal que sobre-expresa pertenece a la misma familia de canales tipo-T y se encuentra perfectamente caracterizado, presentando un perfil de activación e inactivación igual al de los canales Cav3.1 y Cav3.2, bajo las mismas condiciones. Dentro del ensayo de Patch-clamp se usaron dos soluciones, una para evidenciar exclusivamente la activación de canales tipo-T (Cav3.1, Cav3.2 y Cav3.3) y otra para detectar la activación de canales iónicos en general (calcio, cloro, potasio y sodio).

Para realizar el análisis de la corriente de calcio en las líneas celulares derivadas de tejido prostático, primeramente se estandarizaron las condiciones aplicando los protocolos sp 30150 y IV -500 a la línea control HEK-3.3. El protocolo sp 30150 se estandarizó aplicando un HP de -100mV, con un pulso despolarizante de -30mV por 100ms (Fig. 11 A), observando inflexiones de corriente entrante de Ca⁺ seguido poco después por pulsos despolarizantes, alcanzando una corriente con un valor máximo de -30mV; una vez alcanzado el valor máximo, la señal de la corriente disminuye su amplitud hasta alcanzar el valor cero o de reposo. La aplicación del protocolo IV -500, permitió observar la relación corriente voltaje, aplicando pulsos despolarizantes de 100ms y observando así una clásica cinética de activación e inactivación (Fig. 11 B); con dicho protocolo se observó una cinética en donde la despolarización aumenta hasta alcanzar su valor máximo de -30mV, en donde los canales se encuentran completamente abiertos; para posteriormente cambiar la dirección de la corriente de entrante a saliente a

mV muy positivos. Una vez establecidas las condiciones y los protocolos en la línea control HEK-3.3, se prosiguió a aplicar dichos protocolos (IV -500 y sp 30150) a las líneas derivadas de tejido prostático RWPE-1 y WPE1-NB26. La aplicación de ambos protocolos en estas líneas celulares permitió determinar, que a diferencia de lo observado en la línea control HEK-3.3, no hubo activación de los canales iónicos, ya que no se detectó la activación de los canales tipo-T a -30mV ni en RWPE1 ni en WPE1-NB26 (Fig. 11 C), y tampoco alguna inflexión en la curva a -30mV. Así mismo, cuando se les aplicó el protocolo IV -500, tampoco se observó activación de los canales en ninguna de las líneas de próstata evaluadas. De acuerdo a estos resultados, los canales evaluados no se encuentran activos en estas líneas celulares, por lo que consideramos conveniente corroborarlo, probando diferentes soluciones que comúnmente permiten la activación de canales iónicos en general. De esta manera tendríamos la confianza en que nuestras células estuvieran creciendo adecuadamente y que la técnica de Patch-clamp, estuviera siendo realizada adecuadamente, y determinar así que la falta de actividad de los canales se deba a una posible regulación de estos y no a factores propios de la técnica. Para determinar la activación de canales iónicos en las células se usó el protocolo de IV -50, (Fig. 11 D) observando que únicamente se generaban corrientes salientes de -10 a +80mV con características similares a corrientes de potasio; corroborando así que la técnica se estaba efectuando de manera correcta y que probablemente la inactivación de los canales se debe a algún tipo de regulación en ellos. De hecho, es conocido que la expresión y actividad de estos canales se encuentra limitada en tejido no excitable, y que su activación e inactivación se encuentra regulada en células sanas por varios mecanismos, pero principalmente en células cardiacas. Por ello, en las líneas celulares estudiadas pudiera suceder algún mecanismo que este regulando la inactivación de los canales.

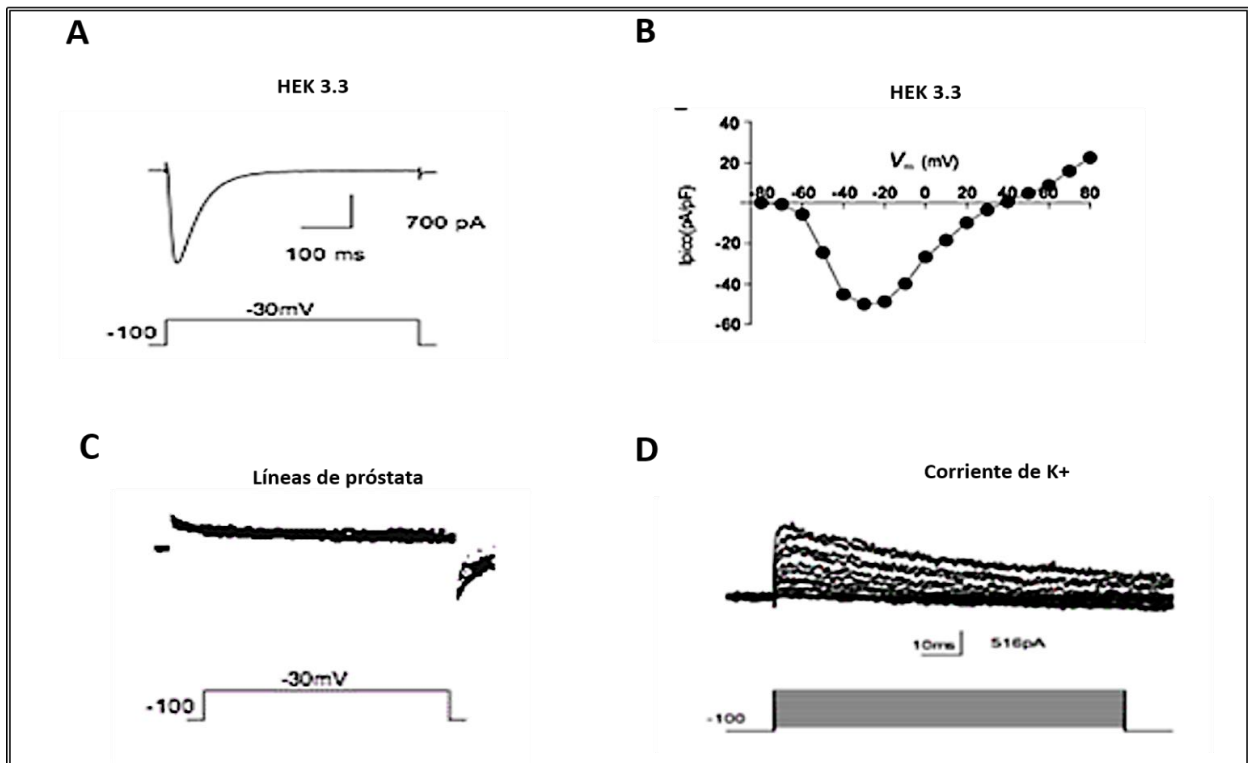


Fig. 11.- Patch-clamp de canales tipo-T en las líneas celulares derivadas de próstata y HEK 3.3. A) Trazos de corriente de calcio a -30mV en la línea control HEK 3.3. B) Curva relación corriente-voltaje (i-v) de línea control HEK 3.3. C) Trazos de corriente de calcio a -30mV representativa de la líneas de próstata (RWPE1 y WPE1-NB26) . D) Curva de la relación corriente-voltaje (i-v) de K+ de -80 a +80mV en la líneas de próstata (RWPE1 y WPE1-NB26).

Con estos resultados, se determinó que la expresión de los canales es muy baja para ambas líneas celulares y que aunque haya cierta expresión de ellos en la línea RWPE1, estos no se encuentran activos, lo que permite deducir que muy posiblemente los canales tipo-T no participan en el desarrollo del cáncer de próstata, ni están involucrados en las diferencias que existen entre las líneas RWPE1 (no invasiva) y WPE1-NB26 (muy invasiva); sin embargo habría que realizar otros estudios en tejido tumoral prostático para evaluar los niveles de expresión y el comportamiento de estos canales, ya que las células cancerosas utilizadas en este trabajo (WPE1-NB26), fueron alteradas *in vitro* con un tratamiento con metil-nitrosourea (MNU), y podría ser que no se comporten igual que células cancerosas provenientes de tejido tumoral.

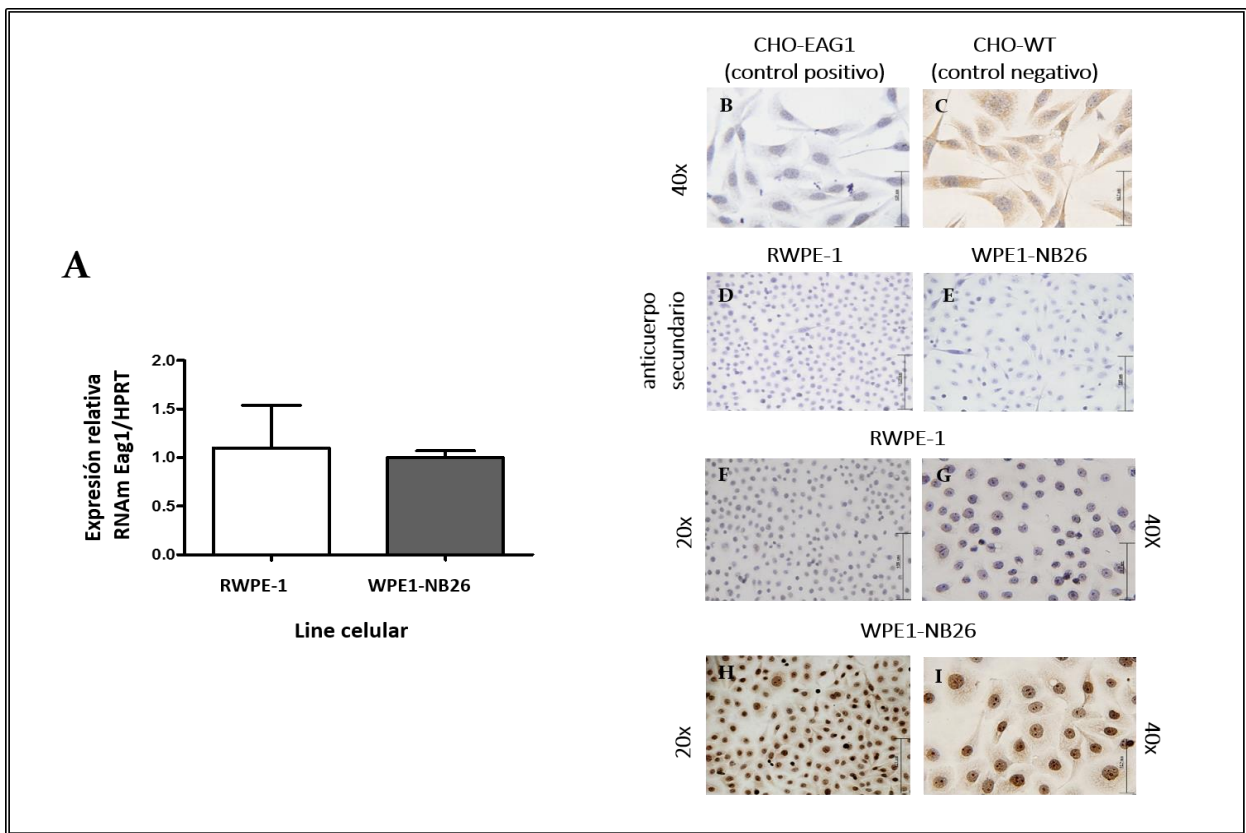
7.3. Análisis de la expresión del canal Eag1 en líneas de próstata.

Una vez descartado en este trabajo el uso de los canales tipo-T como blancos terapéuticos en cáncer de próstata, se decidió iniciar la búsqueda de otros canales que pudieran ser empleados y de los cuales existen antecedentes de su expresión elevada en diferentes tejidos cancerosos. Este es el caso del canal de potasio Eag1, que se ha visto relacionado con el desarrollo de diferentes tipos de cáncer. De hecho, en los ensayos de Patch-clamp en las líneas RWPE1 y WPE1-NB26 se observaron corrientes de potasio, lo que pudiera indicar actividad de este canal en ellas. Por esta razón, se procedió a determinar primeramente si estas líneas celulares expresaban el canal de potasio Eag1 para valorar por un lado, la posible participación de este canal en el cáncer de próstata, y por otro, su potencial como blanco terapéutico. Decidimos realizar este análisis únicamente en las dos líneas de nuestro modelo celular que representan los extremos en el desarrollo de este tipo de cáncer: la que representara a células de próstata sin características cancerosas (RWPE-1) y la que tiene características cancerosas e invasivas (WPE1-NB26).

Para determinar los niveles de expresión de RNAm Eag1 en las líneas celulares de próstata RWPE-1 y WPE1-NB26 se realizaron ensayos de RT-qPCR, observándose que la expresión relativa de RNAm de Eag1 era similar y no significativa entre ambas líneas celulares (Fig. 12 A). Al no observar diferencias significativas entre los niveles de RNAm de estas líneas celulares, se decidió analizar mediante inmunocitoquímica los niveles de proteína para determinar, por un lado si existe alguna diferencia en la expresión de este canal entre las dos líneas de próstata, y por otro, conocer la distribución sub-celular de la proteína. Interesantemente, observamos diferencias importantes en la expresión de Eag1 a nivel de proteína entre estas líneas celulares, mostrando niveles bajos o casi nulos de proteína en la línea RWPE-1 y limitándose su localización sub-celular a la membrana y al citoplasma (similar a lo observado en el control positivo CHO-EAG1) (Fig. 12 C); mientras que en la línea WPE-NB26 (Fig. 12 I) se observó una expresión muy abundante de este canal y con una localización sub-celular no solo limitada a la

membrana, como se esperaría al ser un canal conductor de iones K^+ ; sino que también se encontró de manera abundante en citoplasma y núcleo (Fig. 12 I).

La diferencias en los niveles de expresión y en la localización del canal Eag1 entre las líneas RWPE1 y WPE-NB26 sugiere que Eag1 en la línea WPE-NB26, pudiera tener alguna función no canónica probablemente afectando la expresión de genes relacionados con algún paso en el proceso del desarrollo del CP, como son la proliferación y/o la invasividad.



7.4. Proliferación celular de las líneas de próstata

La observación de claras diferencias entre las líneas celulares, tanto en los niveles proteicos de Eag1 como en su localización sub-celular, nos motivó a determinar si existían diferencias en su tasa de proliferación, ya que se ha demostrado en otros tipos de cáncer que la sola expresión de Eag1 genera un incremento en la proliferación celular [71].

Para determinar estas posibles diferencias en la tasa de proliferación celular de ambas líneas, primeramente se evaluó como un indicador indirecto de este proceso, mediante inmunofluorescencia la expresión de Ki67, una proteína asociada a proliferación celular que se expresa en todas las fases activas del ciclo celular y que comúnmente es usada como marcador de proliferación celular. En la línea WPE-NB26 se observó que el nivel de Ki67 es mucho más abundante que en RWPE-1 (Fig. 13 A), lo que sugiere de manera cualitativa, que la línea WPE1-NB26 prolifera de manera más activa que la RWPE-1. Para determinar de manera cuantitativa esta aparente diferencia en la proliferación celular, se realizaron ensayos en los que se sembró el mismo número de células de ambas líneas celulares y se mantuvieron en condiciones de crecimiento idénticas por 1, 3, 5 y 7 días; posteriormente se determinó la proliferación celular mediante el ensayo de Alamar blue, que está basado en la evaluación del ambiente reductor generado en células metabólicamente activas, y con el cual se obtuvo el porcentaje de proliferación. Para el caso de la línea WPE-NB26, se determinó que su crecimiento era muy rápido, alcanzando un 80% de confluencia en tres días de cultivo, mientras que para la línea RWPE1, se observó una proliferación mucho menos activa, alcanzando una confluencia solo del 48% hasta los 7 días de cultivo (Fig. 13 B).

Tanto los niveles de Ki67 como el ensayo de proliferación celular nos permitieron determinar que efectivamente la tasa de crecimiento es mayor y más rápida en la línea celular WPE-NB26, lo que nos hizo pensar que probablemente Eag1 pudiera tener una participación en el aumento de la proliferación en esta línea celular, ya que se ha

demostrado que la expresión Eag1 incrementa de manera importante la proliferación celular [60, 79, 85].

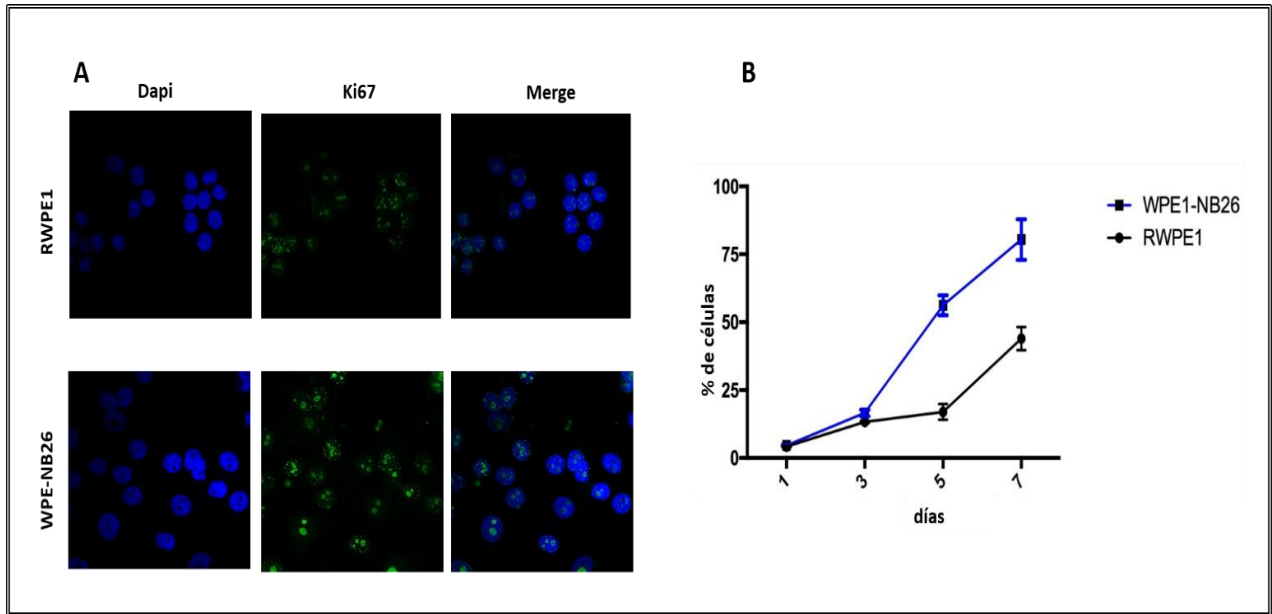


Fig. 13.- Proliferación celular en las líneas de próstata. Determinación de la proliferación celular de las líneas RWPE1 y NB26 por inmunofluorescencia (cualitativa) y mediante el ensayo de azul alamar. A) Inmunodetección de Ki67 en las líneas WPE-NB26 y RWPE-1. B) Gráfica del % de proliferación de las líneas celulares RWPE1 y WPE1-NB26 obtenidas a 1, 3, 5, y 7 días. El porcentaje de proliferación se obtuvo graficando las absorbancias obtenidas.

7.5. Análisis del efecto del astemizol sobre la proliferación en líneas de próstata

Uno de los inhibidores que bloquean muy eficientemente la actividad del canal Eag1 es el astemizol. Por esta razón, fue de nuestro interés evaluar tanto la tasa de proliferación como la apoptosis de las líneas celulares derivadas de tejido prostático, cuando la función de este canal es inhibida por un tratamiento con este fármaco.

Para saber si el bloqueo de Eag1 tenía algún efecto sobre la tasa de proliferación celular en las líneas WPE-NB26 (que expresa en abundancia la proteína Eag1) y RWPE-1 (con poca expresión de Eag1), se realizaron ensayos evaluando la proliferación

mediante el método de reducción de MTT. Este método se basa en la reducción metabólica del MTT por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa que se genera en altas cantidades en células metabólicamente activas, por lo que al reducir el MTT, genera sales de formazan cuya concentración es proporcional al número de células vivas. Para este ensayo se sembraron 5,000 células dejándolas crecer por 72 hrs; posteriormente se dio tratamiento con diferentes concentraciones de astemizol (100nM, 200nM, 500nM y 2 μ M) por 96 hrs. En la línea celular RWPE-1 se observó que el tratamiento con astemizol no generó efecto alguno en la mayoría de los tratamientos, observándose únicamente disminución en la tasa de proliferación a la concentración más alta utilizada (de 2 μ M) (Fig. 14 A); sin embargo en la línea WPE-NB26, se observó mucho mayor sensibilidad al tratamiento con astemizol, teniendo una disminución en la tasa de proliferación aún a concentraciones de 200 y 500nM, con una disminución muy significativa a 2 μ M (Fig. 14 B), disminuyendo su proliferación hasta en un 85%. Estos resultados sugieren que el efecto tan marcado del astemizol en la línea celular WPE-NB26, puede deberse al eficiente bloqueo del canal Eag1, que es expresado abundantemente en esta línea celular, indicando que este canal pudiera participar de manera importante en la proliferación celular y con ello, en el desarrollo del cáncer de próstata.

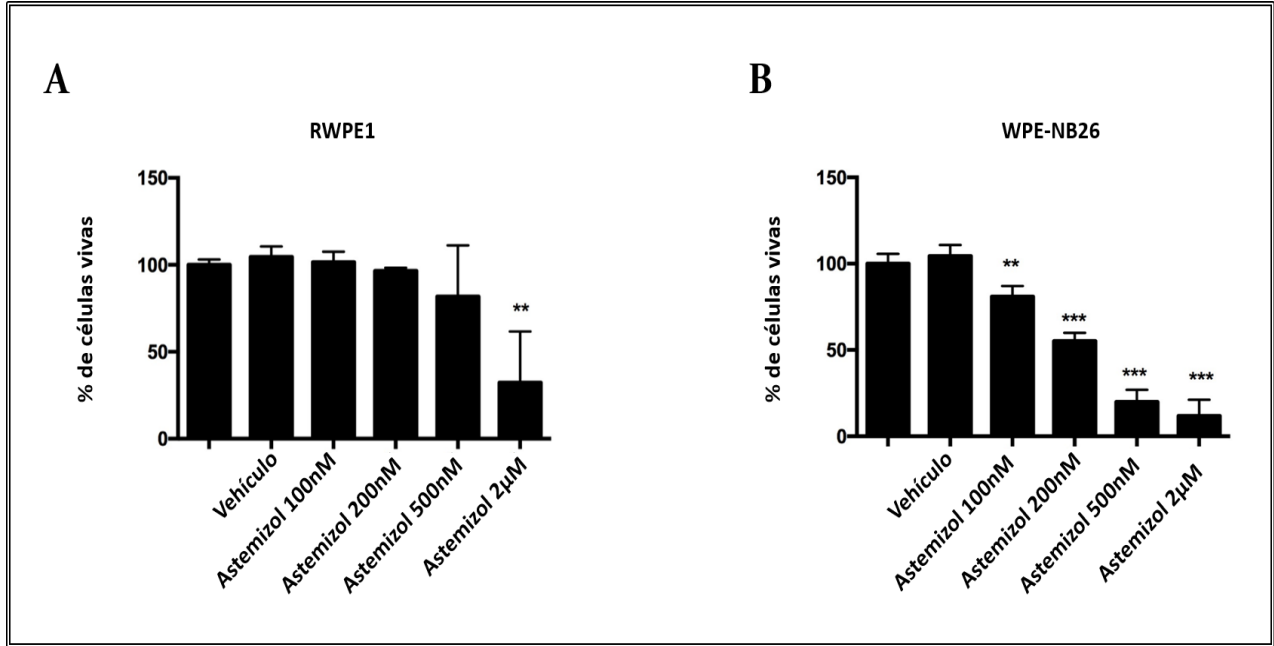


Fig. 14.- Efecto antiproliferativo del astemizol en líneas de próstata. La líneas RWPE1 y WPE-NB26 se trataron con astemizol a 100nM, 200nM, 500nM y 2µM, como sus correspondientes controles (medio y vehículo), por 96 hrs. y su proliferación se evaluó mediante el ensayo de MTT A) Tratamiento con astemizol en las células RWPE-1. B) Tratamiento con astemizol en WPE-NB26. Como vehículo se usó DMSO. Los resultados mostrados en las gráficas son la media \pm SD de n=3, **P<0.001 vs medio y *** P<0.0001.

7.6. Inducción de la apoptosis con astemizol en la línea WPE-NB26.

El efecto que el astemizol tuvo sobre la proliferación de la línea celular de cáncer de próstata WPE-NB26 sugiere que el bloqueo de la actividad del canal Eag1 pudiera inducir muerte celular en ellas, como se ha observado en nuestro grupo de investigación en células derivadas de otros tipos de cáncer. Por esta razón, decidimos determinar si el tratamiento con astemizol induce apoptosis en estas células. La apoptosis fue evaluada mediante el ensayo con anexina V con el cual se determinan células en apoptosis temprana debido a que en estas células la molécula fosfatidilserina (a la cual se une la Anexina V, marcada con un fluorocromo) es translocada de la cara interior a la cara exterior de la membrana plasmática. Para estos ensayos las células WPE-NB26 fueron tratadas con astemizol 200nM, 500nM y 2µM, posteriormente se realizó el ensayo de anexina V; finalmente la fluorescencia en las células fue evaluada mediante citometría de flujo. Las gráficas representativas de la lectura del citómetro muestran que cuando se

usan bajas concentraciones de astemizol (200nM y 500nM), no existe un aumento en el porcentaje de células en apoptosis (Fig. 15 A); sin embargo con la concentración de 2µM, el porcentaje de apoptosis incrementa significativamente (Fig. 15 A). La graficas de los porcentaje de células vivas muestran que a la concentración más alta 2µM, la apoptosis tardía se indujo significativamente en un 45% y en un 10% la necrosis (Fig. 15 B); esto muestra el papel que juega Eag1 en procesos muy importantes para el desarrollo del cáncer de próstata, como son la proliferación y la apoptosis.

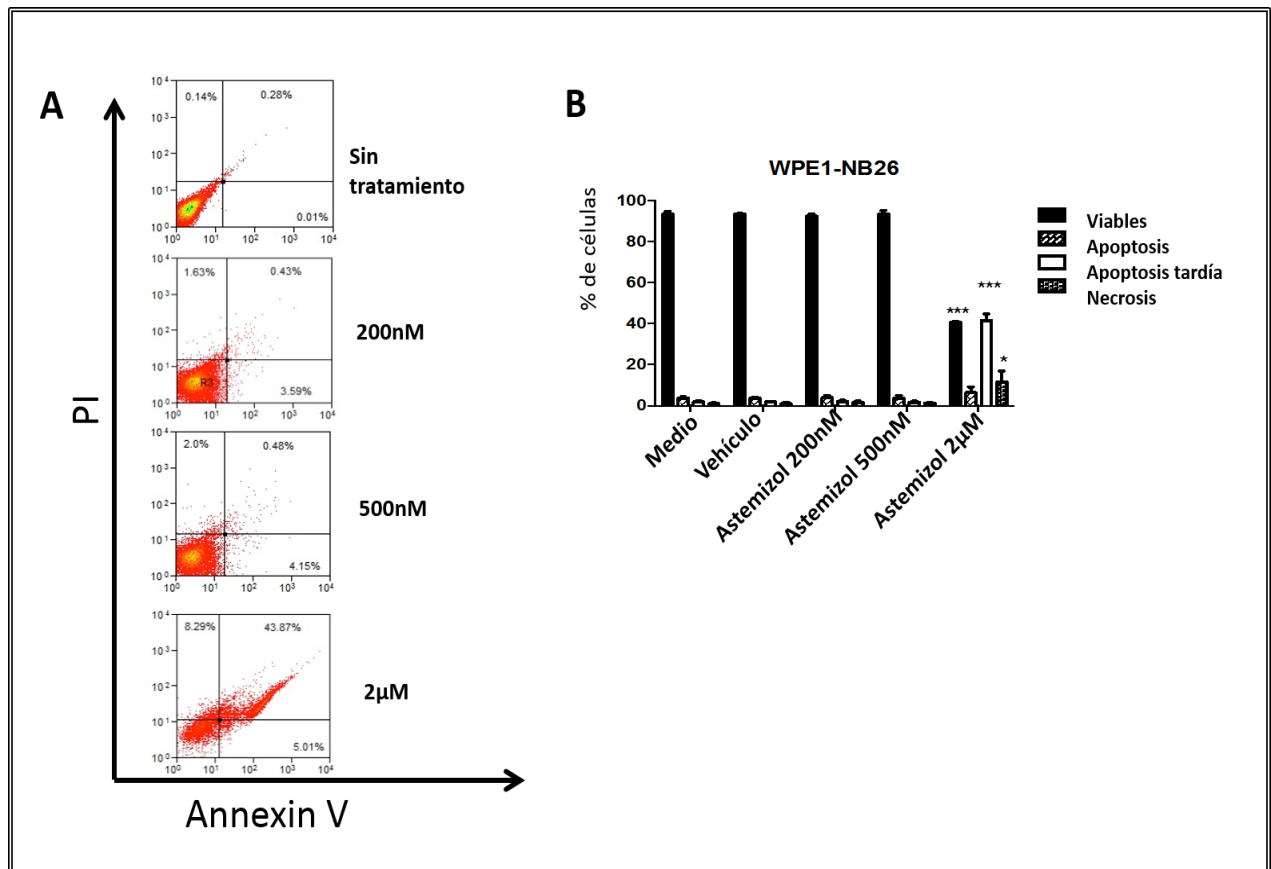


Fig. 15.- Inducción de la apoptosis con astemizol en la línea WPE-NB26. La línea celular WPE1-NB26 fue incubada en presencia de diferentes concentraciones de astemizol (o sus controles medio, vehículo (DMSO)), por 96 hrs. La apoptosis fue evaluada por medio del ensayo Annexina V. A) Gráfica representativa del ensayo de apoptosis en la línea WPE-NB26 con medio y astemizol 200nM, 500nM y 2µM de astemizol. B) Gráfica del porcentaje de células en apoptosis WPE-NB26, en los diferentes tratamientos. Los valores del control (medio) fueron normalizados a uno. Las barras de las gráficas indican la media ± SD of n=3, *P<0.01 vs medio, y ***P<0.0001 vs medio

8. DISCUSIÓN

En las últimas décadas los canales iónicos han sido propuestos como blancos potenciales para el diagnóstico y la terapia del cáncer, ya que se ha visto que tienen un papel importante durante el desarrollo del cáncer [25, 93]. En cáncer de próstata se ha observado que la expresión de ciertos canales iónicos (Cl^- , Ca^{2+} , K^+ y Na^{2+}) se encuentra desregulada, favoreciendo así una alteración en varios procesos celulares como proliferación, apoptosis y diferenciación [26, 94]. En los últimos años se ha sugerido que la modulación del Ca^{2+} y de sus canales en el proceso del cáncer pudiera ser empleada como una herramienta terapéutica y/o de diagnóstico [31]; ya que estudios de las bombas y canales de Ca^{2+} en cáncer proponen que estos favorece la progresión tumoral [7, 27, 37].

Aunque en cáncer de próstata existen pocos reportes acerca del papel de los canales tipo-T, se ha visto que estos canales iónicos podrían estar involucrados en su desarrollo debido a que se expresan de manera diferencial en varios tipos de líneas celulares derivadas de este cáncer, favoreciendo la proliferación celular y diferenciación neuroendocrina. Es por ello que fue de nuestro interés comenzar nuestro estudio en un modelo de líneas celulares (RWPE-1, WPE1-NA14, WPE1-NA22 y WPE1-NB26) que ha sido muy poco estudiadas, por lo que un primer paso en este trabajo, fue determinar la expresión de estos canales en nuestro modelo, ya que esto podría ayudar a conocer si alguno de estos canales son requeridos para el desarrollo de este cáncer.

La evaluación de la expresión de estos canales se realizó tanto analizando los niveles de RNAm como de proteína, observando que en la línea no cancerosa RWPE-1 el RNAm del canal Cav3.1 presenta una expresión significativamente mayor que en las líneas con características cancerosas WPE1-NA14, WPE1-NA22 y WPE1-NB26 (Fig. 9A). Los resultados de expresión observados en las líneas estudiadas a nivel de RNAm del canal Cav3.1 fueron acordes a lo esperado, ya que en líneas celulares derivadas de otros tipos de tumores, se ha reportado que este canal pudiera estar actuando como un

supresor de tumor. De hecho, se conoce que en algunas líneas de cáncer de colon, mama, pulmón y líneas hematopoyéticas, la región promotora del gen que codifica para este canal se encuentra metilado, por lo que su expresión está disminuida o totalmente ausente; en contraste a lo observado en líneas celulares no cancerosas [52, 53]. Sin embargo al analizar los niveles de proteína de Cav3.1, sorprendentemente solo detectamos su presencia en la línea celular WPE-NB26, mientras que en las células RWPE1 que presentaba una mayor expresión del canal, no detectó la proteína (Fig. 10 A). Esto indica que en nuestro modelo de estudio, Cav3.1 se comporta diferente a lo reportado, ya que en otras líneas de cáncer este canal se encuentra silenciada su expresión actuando como un probable supresor de tumor, como ha sido demostrado en la línea de cáncer de mama MCF-7 en la que el aumento de los niveles de este canal disminuye su proliferación y causa apoptosis [54].

Para el caso del canal Cav3.2 al analizar su expresión tanto a nivel de RNAm como de proteína en las líneas RWPE-1, WPE1-NA14, WPE1-NA22 y WPE1-NB26, observamos que únicamente la línea con características menos invasivas RWPE1 expresa el canal tanto RNAm como proteína, aunque a niveles bajos; mientras que en las otras líneas celulares no se detectó expresión (Fig. 9 B y 10 B). Este resultado es muy interesante, ya que se esperaba detectar una mayor expresión en las líneas más cancerosas y agresivas de acuerdo a lo ya reportado, ya que en líneas de cáncer de próstata se ha determinado que una sobre-expresión del canal favorece la proliferación y neurodiferenciación endocrina, permitiendo así la liberación de mitógenos, la independencia a andrógenos y una mayor agresividad [55, 95, 96]. Esta baja expresión del canal puede deberse a que estas líneas no proviene de un cáncer sino que han sido modificadas mediante un carcinógeno para asemejar las diferentes etapas del cáncer de próstata, por lo que el tratamiento con el carcinógeno pudo haber modificado los niveles de expresión de estos canales.

Al observar que en general los niveles de expresión de los canales Cav3.1 y Cav3.2 en las líneas celulares de nuestro modelo, son diferentes a lo ya reportado para otros tipos de cáncer, así como para otras líneas de cáncer de próstata, se decidió determinar si los canales Cav3.1 y Cav3.2 expresados en las líneas celulares que representan los

extremos en capacidad invasiva RWPE-1 y WPE1-NB26, se encontraban activos, es decir, si presentaban corriente de calcio.

Para determinar la actividad del canal Cav3.2 expresados en RWPE-1 y Cav3.1 expresado en WPE1-NB26, se realizaron ensayos de Patch-clamp; sin embargo no se observó actividad de los canales en ninguna línea celular (únicamente en las células utilizadas como control positivo). Tampoco se detectó corriente alguna perteneciente a iones calcio (Fig. 11 C). Esto se puede deber a diversos mecanismos de regulación, ya que se ha reportado que las hormonas y la liberación de neurotransmisores afectan o inhiben la activación de estos canales iónicos; así mismo la regulación de la actividad de proteína G, de la PKC y la PKA, provocan una regulación de los canales manteniéndolos inactivos. La inactividad del canal Cav3.2 en la línea RWPE1, en la cual se expresa el canal tanto a nivel de RNAm como de proteína, puede deberse a algún tipo de regulación como las ya mencionadas que pudiera modificar la función de este canal, o bien a que el tejido prostático es relativamente poco excitable, si se le compara con otros tejidos como el cardiaco, por lo que la actividad de estos canales en próstata no sería totalmente requerida [7]. Durante el registro de corriente únicamente se detectaron corrientes pertenecientes a iones potasio (Fig. 11 D). Estos resultados nos permitieron determinar que probablemente los canales de tipo-T en nuestro modelo de estudio no están activos y por lo tanto no tienen una participación importante en el establecimiento del fenotipo propio de estas células ni en la adquisición de un fenotipo más agresivo; ya que la expresión de ambos canales a nivel de proteína es sumamente bajo y no existe un flujo de iones a través de estos canales; siendo el flujo de iones muy importante principalmente en el canal Cav3.2 para favorecer el desarrollo de diferentes tipos de cáncer y la neurodiferenciación endocrina; ya que se ha visto que el bloqueo del flujo de calcio a través de este canal mediante el uso de diferentes fármacos (mibefradil, paclitaxel taspigargina) genera una disminución en la proliferación e invasión. De hecho, se ha determinado que una interrupción de la entrada del calcio intracelular cuando se bloquea este canal genera un importante incremento de la apoptosis lo que es indicador de la participación de este canal en alguno de los procesos que favorecen la proliferación celular y la agresividad de las células cancerosas [97, 98]. Al tratarse de un canal que

usualmente no se desactiva totalmente en células cancerosas que lo sobre-expresan, permite pequeños flujos de calcio y estas corrientes constantes favorecen a su vez la proliferación celular [95].

En base a todo lo anterior, se determinó que la expresión del canal Cav3.1 en la línea celular RWPE1 no tiene una participación supresora de tumor como se pensaba al inicio del proyecto, ya que no se detectó la proteína de este canal en las células no cancerosa solo en la línea RWPE1; así mismo se determinó que el canal Cav3.2 en la línea WPE-NB26 no parece favorecer el fenotipo agresivo e invasivo, ya que únicamente se expresaba en la línea RWPE-1 y no en la altamente invasiva WPE1-NB26. Es decir, de acuerdo a nuestros datos, estos canales no tienen ninguna participación en los procesos celulares fundamentales de las líneas celulares estudiadas.

Por otro lado, las ausencia de corrientes de calcio en las líneas RWPE-1 y WPE-NB26 nos llevó a analizar si existían otras canales iónicos activos en estas líneas, observando corrientes de iones de potasio en los ensayos de Patch clamp en las líneas RWPE-1 y WPE1-NB26, lo que nos llevó a enfocarnos en estudiar la posible participación de canales de potasio en el desarrollo del cáncer de próstata, mediante su análisis en estas líneas celulares. Entre los canales de potasio cuya expresión se ha detectado de manera aberrante en líneas celulares derivadas de diferentes tipos de tumores y que parece participar de manera importante en el desarrollo del cáncer, es el canal de potasio Eag1. En tejido normal este canal tiene una expresión muy limitada expresándose solo en placenta, mioblastos y cerebro; mientras que en tumores, se ha detectado en cáncer de mama, cervix, colon, hígado, pulmón y otros, observándose que su expresión aberrante favorece el desarrollo del cáncer [72, 74, 89]; por lo cual se le ha sugerido como un posible blanco terapéutico [70, 72, 73, 99]. En cáncer de próstata se desconoce específicamente el papel que este canal juega; sin embargo en muestras de pacientes se ha visto que en tejido epitelial normal de próstata Eag1 es casi indetectable teniendo una expresión muy baja de alrededor del 6.7%-7.4%, sin embargo en carcinoma de próstata su expresión es muy alta alrededor del 54%-56% [90]. A pesar de que se ha visto que su expresión es diferencial en tejido de próstata normal y en cáncer

de próstata, aún se desconoce exactamente cuál es su papel dentro de este tipo de cáncer y si participa en alguno de los estadios del desarrollo de este cáncer.

Recientemente en próstata se ha visto que Eag1 se expresa tanto en la línea inmortalizada PNT1 como en las células cancerosas e invasivas DU-145 [91]. Nosotros analizamos también cual era la expresión de Eag1 en dos líneas de próstata del modelo de líneas celulares antes usadas para el estudio de los canales tipo-T: WPE1-NB26 (altamente invasiva y con características cancerosas) y RWPE-1 (línea de próstata inmortalizada con HPV-18). Durante el análisis de la expresión de Eag1 por RT-qPCR, se observó que la línea WPE1-NB26 expresa Eag1 (Fig. 12 A), lo cual era de esperarse ya que se ha visto que células con fenotipos malignos, agresivos e invasivos sobre-expresan el canal Eag1 y que la sola expresión de este canal modifica a las células hacia un fenotipo más agresivo llegando a formar tumores *in vivo*, transformación celular, rápido crecimiento y crecimiento sin contacto [71, 100]; sin embargo, en la línea RWPE-1 donde se esperaba una baja o nula expresión del canal, ya que las células no son excitables ni cancerosas, se observó que el nivel de RNAm de Eag1 era semejante al de la línea WPE1-NB26 (Fig. 12 A). Una posible explicación a este resultado, es que las células RWPE1 no son células normales, ya que han sido inmortalizadas con los oncogenes de HPV18 por lo que pudiera existir en ella una regulación particular que lleve a la expresión de RNAm de Eag1. Al igual que nosotros, también se ha observado que líneas celulares inmortalizadas con SV40 o con los oncogenes del virus del papiloma humano y sin fenotipo canceroso, como PNT1, llegan a expresar Eag1 [60, 91]. Se ha demostrado en otras líneas celulares que transfecciones de los oncogenes (E6/E7) de HPV en cultivos primarios de queratinocitos normales, favorecen una expresión o incremento del RNAm de Eag1, en comparación con cultivos primarios de queratinocitos sin transfectar [60]; lo que demuestra que la sola expresión de los oncogenes de HPV puede estar favoreciendo y regulando la expresión del canal Eag1 en células que no presentan un fenotipo maligno. También se ha determinado que Eag1 puede expresarse en células aún no cancerosas, pero que presentan alguna alteración que las predispone a desarrollar cáncer; ya que la expresión de Eag1 en cérvix con hiperplasia adenomatosa, puede actuar como un marcador que indique la predisposición para

desarrollar cáncer de endometrio debido a la presencia de ciertas alteraciones [73]. Estas observaciones refuerzan la propuesta de que Eag1 podría ser un marcador temprano de alteraciones que pueden predisponer al desarrollo de cáncer.

A pesar de que se observó que ambas líneas celulares presentan niveles de expresión similar del RNAm de Eag1, diversos mecanismos como la regulación de miRNAs pueden regular la presencia y la función del producto proteico como las modificaciones protraduccionales, por lo que se decidió determinar por inmunocitoquímica cuáles eran los niveles de expresión y la localización sub-celular de la proteína Eag1 en la líneas RWPE-1 y WPE1-NB26 y así tratar de analizar de qué manera este canal iónico pudiera favorecer el fenotipo agresivo y tumoral en la línea WPE1-NB26. En la línea RWPE-1 se observó que la expresión de Eag1 no era homogénea entre las células, ya que en los ensayos de inmunocitoquímica se detectó muy pobremente en algunas células, con una localización completamente a nivel de membrana (Fig. 12 F y G), pero inclusive en una gran cantidad de ocasiones la detección fue nula (datos no mostrados). La localización sub-celular observada de la proteína, corresponde con lo esperado, dada la función canónica de este canal, ya que al ser un canal de potasio se espera se encuentre localizado en la membrana plasmática por sus funciones acarreadoras de iones de potasio con el fin de despolarizar a las células para que estas entren al ciclo celular de forma regulada [101]. Sin embargo, las fluctuaciones que se observaron en el nivel de proteína de este canal en la línea RWPE-1, no eran esperadas, ya que no existen reportes previos en este sentido. Estas variaciones en los niveles proteicos de Eag1 pudieran deberse a su constante remoción de la membrana plasmática, por medio de una endocitosis rápida seguida de un transporte por lisosomas para su degradación [102], permitiendo de esta manera que en células sanas exista un control en los niveles del canal.

De hecho, se ha reportado que durante el ciclo celular existen cambios en los niveles de este y de otros canales de potasio, y que sus incrementos durante la etapa G1/S permiten una hiperpolarización transitoria favoreciendo la progresión del ciclo celular [103-105]; estos incrementos parecen participar también en la reorganización del citoesqueleto durante la etapa G2/M [69]. Por ello, las fluctuaciones en los niveles de

RNA_m y de proteína observadas en la línea RWPE1, pudieran deberse a que en esta línea celular, aún existen estos mecanismos de regulación y que los niveles del canal se incrementan solo cuando las células van entrar al ciclo celular para proliferar.

En el caso de la línea WPE1-NB26 se detectó una alta expresión del canal a nivel de proteína observándose no solo la localización canónica en la membrana plasmática, sino también que presentaba una localización citoplásmica y nuclear (Fig. 12 H y I). Existen trabajos que reportan la localización de algunos canales iónicos en sitios distintos a su sitio canónico, como es el caso del canal de calcio tipo L, el cual sufre fragmentación de su dominio carboxilo terminal, permitiendo que este dominio se dirija al núcleo y se asocie a proteínas nucleares endógenas para la regulación de varios genes [106]. Aunque para Eag1, algunos trabajos han reportado la localización nuclear de la proteína, además de su localización y función canónica, se desconoce tanto el mecanismo que la lleva al núcleo como su función; sin embargo se ha sugerido que pudiera tener funciones independientes al flujo iónico, posiblemente jugando alguna función regulatoria en ciertos genes [107, 108]. Se ha reportado que la proteína Eag1 presenta varios sitios putativos de localización nuclear en su dominio carboxilo terminal [99, 109] y que en el procesamiento alternativo de su RNA_m, puede producirse una proteína soluble capaz de entrar al núcleo y activar vías de señalización [110]. Por ello, la fuerte localización nuclear de este canal en la línea WPE1-NB26, sugiere que pudiera estar llevando a cabo funciones no-canónicas participando en la regulación de algunos procesos celulares, ya que al estar desregulada su expresión probablemente este canal esté favoreciendo una mayor proliferación en células cancerosas.

Considerando que entre los procesos celulares en los que Eag1 se ha visto involucrado está la proliferación, fue nuestro interés determinar si en las líneas celulares incluidas en este modelo de estudio, existían diferencias en la tasa de proliferación. Para ello se determinaron los niveles de Ki67 en cada línea celular, así como una curva de proliferación con azul alamar que permitió conocer el tiempo de crecimiento para cada línea. Con estos ensayos se determinó que efectivamente la línea menos agresiva RWPE-1 prolifera más lento, teniendo un crecimiento del 50% en 7 días y expresando en menor proporción al marcador Ki67; mientras que la línea WPE1-NB26 alcanzó el 80%

de crecimiento en 7 días expresando en mayor proporción a Ki67 (Fig. 13 A). Estas diferencias altamente significativas en la velocidad de crecimiento entre estas líneas celulares, sugieren que en la línea que expresa abundantemente Eag1, el canal podría tener una participación importante, ya que se ha visto en diferentes líneas cancerosas que Eag1 promueve la proliferación celular. En células CHO, se ha visto que la transfección de Eag1 favorece un crecimiento más rápido en comparación con aquellas que no expresan el canal [71]; por lo que el crecimiento descontrolado en las células cancerosas puede deberse a la desregulación de la expresión de Eag1, ya que se ha visto que su silenciamiento con siRNA [77] o su bloqueo con diferentes fármacos (calcitriol, astemizol, imipramina), genera una disminución en la proliferación celular [60, 79, 85].

Al observar que los niveles de proliferación en nuestras líneas empleadas son marcadamente diferentes, se decidió determinar si existía alguna relación con la presencia y aparente funcionalidad del canal Eag1; para este fin, se decidió bloquear el canal con el fármaco astemizol. En la línea WPE1-NB26 se observó una disminución gradual conforme aumentaba la dosis de astemizol, teniendo una disminución en la proliferación del 80 % a la concentración máxima usada de 2 μ M (Fig. 14 B); en la línea RWPE-1 no se observó ninguna disminución a dosis bajas y únicamente cuando se utilizó la dosis más alta se observó efecto (Fig. 14 A), lo cual probablemente se debe a que esta concentración es demasiado elevada y está siendo tóxicas para las células. La disminución de la proliferación inducida por el astemizol en la línea WPE1-NB26 cercana al 80%, es muy similar a la observada en otras líneas estudiadas en nuestro grupo de trabajo, a pesar de que este fármaco actúa como un bloqueador no específico del canal Eag1.

El astemizol es un fármaco que anteriormente se había usado como un anti-histamínico, sin embargo reportes recientes de su uso en cáncer le han atribuido una función bloqueadora del canal Eag1, ya que se une de manera inespecífica a la parte interna del canal generando un bloqueo en el flujo de iones potasio [86, 111]. Se ha observado que este bloqueo *in vitro* reduce significativamente la proliferación en líneas celulares derivadas de cáncer de mama, de cérvix y de hígado [85, 87]; mientras que su

uso en modelos *in vivo* ha demostrado que previene la formación de tumores durante la hepatocarcinogénesis [112], y que disminuye el tamaño del tumor en xeno-transplantes de la línea de cáncer de mama T-47D y en ratones inmunodeficientes [85].

No solo se ha descrito que Eag1 participa en la proliferación celular sino que también puede inhibir la apoptosis, favoreciendo un fenotipo maligno en células cancerosas, como se ha reportado en algunos estudios en los que se demuestra que el bloqueo de este canal mediante tratamiento con astemizol, induce un aumento de la apoptosis en células de cáncer de cérvix [60, 87]. En la línea WPE1-NB26 en la cual se observaron cambios importantes en la expresión de Eag1 y en la proliferación con el tratamiento de astemizol, también se evaluó el efecto de este bloqueador sobre el proceso de apoptosis, determinando que el astemizol induce apoptosis debido al bloqueo del canal Eag1, incrementando en un 45 % la apoptosis tardía y en un 15% la necrosis (Fig. 15). Este efecto también se ha observado en otras líneas de cáncer que no pertenecen a próstata, donde al bloquear Eag1 con astemizol genera un incremento de la apoptosis, como es el caso de las líneas celulares de cáncer de mama SUM-239PE y IDC-1, en las que disminuye además los niveles de RNAm de Eag1 [85]. Esto muestra que el astemizol no solo bloquea la función canónica de Eag1 que permite el paso de iones K⁺, sino que también regula de manera indirecta a Eag1. También se ha determinado que el tratamiento con astemizol induce la autofagia, debido a una sobre-regulación de p53 [113], el cual a su vez regula la expresión de Eag1 a través de la transcripción del miRNA-34. Este miRNA reprime directamente la expresión de Eag1 a nivel post-transcripcional reprimiendo a E2F [82], por lo que la inhibición o alteración de P53 debido al cáncer puede causar una sobre-expresión de Eag1 en células oncogénicas, favoreciendo así la proliferación e inhibiendo la apoptosis.

Además de que se ha determinado que Eag1 participa en la proliferación y en la inhibición de la apoptosis de la línea WPE1-NB6, también este canal pudiera estar jugando otras funciones no estudiadas hasta este momento, ya que en líneas cancerosas se ha observado que puede estar involucrado en la capacidad de invasión de las células. Por ejemplo, en células de cáncer de mama (MDA-MB231), se observó que el bloqueo con astemizol o bien el uso de siRNA específicos para Eag1, favorecen la

disminución de la migración [114]; por lo que en la línea WPE1-NB26 incluida en nuestro estudio, probablemente Eag1 esté también participando en el establecimiento del fenotipo invasivo, el cual pudiera ser contrarrestado mediante el tratamiento con astemizol.

Además de los procesos celulares en los que nosotros observamos que Eag1 participa en la línea WPE1-NB26, en otras líneas celulares también se ha demostrado que esta proteína participa en la regulación de algunos genes, ya que la transfección de Eag1 en células CHO, favorece el desarrollo de vascularización en el tumor mediante el incremento en la expresión de HIF-1 y VEGF [80]. La abundante presencia de Eag1 en el núcleo en la línea WPE1-NB26, podría estar relacionada con alguna de estas funciones no canónicas de la proteína, como lo es la regulación de genes específicos.

Con lo observado en las células RWPE-1 y WPE1-NB26 además de toda la información sobre la función de Eag1 en otros tipos de cáncer, sugiere que el astemizol puede ser una herramienta útil para el tratamiento de pacientes que sobre-expresan el canal Eag1. Probablemente la combinación del astemizol con algún otro fármaco potencie su efecto, como se ha propuesto en cáncer de mama donde el tratamiento con astemizol en conjunto con calcitriol aumenta su efecto antitumoral [88]; de esta manera se tendría un tratamiento capaz de disminuir la proliferación y la invasividad de las células tumorales, así como de promover su apoptosis, llevando a la implementación de un tratamiento más eficaz para el cáncer de próstata.

9. CONCLUSIONES

Se observó que los canales de calcio tipo-T no participaban en el fenotipo propio de las células de próstata ni en sus características invasivas. En el caso del canal Eag1 de manera importante se observó en la línea WPE-NB26 la expresión del canal Eag1 y así como una sensibilidad al tratamiento con astemizol, inhibiendo la proliferación celular e induciendo la apoptosis; sin embargo debido a que este fármaco actúa sobre varias proteínas involucradas en cáncer y no únicamente sobre Eag1, sería importante realizar

ensayos encaminados a elucidar el mecanismo por el cual el astemizol tiene efecto anti-proliferativo y pro-apoptotico en CP.

Los altos niveles de expresión de proteína del canal Eag1 en la línea WPE1-NB26, la disminución de la proliferación y la estimulación de la apoptosis por astemizol, sugiere que este compuesto podría tener relevancia clínica en el tratamiento de tumores con altos niveles de proteína del canal Eag1. De esta forma sería conveniente valorar estrategias alternativas que permitan suprimir la función de este canal, como sería su silenciamiento génico y corroborar su participación en muestras de pacientes con CP, así como determinar más profundamente los efectos en ciclo celular y apoptosis que se debe específicamente al bloqueo del canal por el astemizol. Es importante también realizar estudios in vivo y ensayos clínicos que permitan proponer el uso del astemizol en la terapia del CP, ya que nuestros resultados sugieren que este fármaco podría ser empleado como un nuevo tratamiento para pacientes con este tipo de cáncer que presenten altos niveles de expresión de Eag1 en células tumorales.

10. PERSPECTIVAS

Ya que el tratamiento con astemizol genera una disminución en la proliferación celular e incrementa la apoptosis en la línea celular WPE1-NB26 que expresa altamente la proteína Eag1, es necesario determinar si el efecto sobre estos procesos celulares se debe directamente al bloqueo del canal para ello es importante:

-Realizar ensayos donde se “silencie” el canal Eag1 mediante el uso de siRNAs y evaluar los porcentajes de proliferación y apoptosis en estas células.

-Evaluar la participación de Eag1 en la invasión realizando ensayos de invasión en células tratadas con astemizol a diferentes concentraciones, y en aquellas silenciadas para el gen Eag1.

-Evaluar la expresión de la proteína Eag1 en pacientes con cáncer de próstata en las etapas de dependencia e independencia de andrógenos.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. UK, C.R. *prostate cancer stadistics*. [cited 2015 October 2]; Available from: <http://www.cancerresearchuk.org>.
2. Society, A.C. *Global Cancer Facts and Figures*. 2012 [cited 2015 October 2]; 3rd:[
3. Cancer, I.A.f.R.o. *Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012*. 2012 [cited 2015 September 9]; Available from: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
4. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer Statistics, 2014*. CA:A Cancer Journal for Clinicians, 2014. **62**(1): p. 10-29.
5. Bok, R.A. and E.J. Small, *Bloodborne biomolecular markers in prostate cancer development and progression*. Nature Reviews Cancer, 2002. **2**(12): p. 918-926.
6. Shen, M.M. and C. Abate-Shen, *Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges*. Genes Dev, 2010. **24**(18): p. 1967-2000.
7. Prevarskaya, N., R. Skryma, and Y. Shuba, *Ion channels and the hallmarks of cancer*. Trends Mol Med, 2010. **16**(3): p. 107-21.
8. Sun, Y., J. Niu, and J. Huang, *Neuroendocrine differentiation in prostate cancer*. Am J Transl Res, 2009. **1**(2): p. 148-62.
9. Liao, J.H., et al., *Extracellular calcium as a candidate mediator of prostate cancer skeletal metastasis*. Cancer Research, 2006. **66**(18): p. 9065-9073.
10. Bostwick, D.G., et al., *Human prostate cancer risk factors*. Cancer, 2004. **101**(10 Suppl): p. 2371-490.
11. Hussein, S., S. Satturwar, and T. Van der Kwast, *Young-age prostate cancer*. Journal of Clinical Pathology, 2015. **68**(7): p. 511-515.
12. Poppel, M.B.a.H.v., *Management of prostate cancer* Springer, Editor. 2012. p. 334.
13. Carter, B.S., et al., *Mendelian inheritance of familial prostate cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(8): p. 3367-71.
14. Crawford, E.D., *Epidemiology of prostate cancer*. Urology, 2003. **62**(6 Suppl 1): p. 3-12.
15. Haas, G.P. and W.A. Sakr, *Epidemiology of prostate cancer*. CA Cancer J Clin, 1997. **47**(5): p. 273-87.
16. Michel Bolla, H.v.P., *Management of Prostate Cancer*. 2012: Springer, Berlin, Heidelberg.
17. Gronberg, H., *Prostate cancer epidemiology*. Lancet, 2003. **361**(9360): p. 859-64.
18. Hoffman, R.M., et al., *Racial and ethnic differences in advanced-stage prostate cancer: the Prostate Cancer Outcomes Study*. J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(5): p. 388-95.
19. Jin, J.-K., *Steps in Prostate Cancer Progression that lead to Bone Metastasis*. Int J Cancer, 2011. **128**: p. 2545-2561.

20. Li, L.C., P.R. Carroll, and R. Dahiya, *Epigenetic changes in prostate cancer: implication for diagnosis and treatment*. J Natl Cancer Inst, 2005. **97**(2): p. 103-15.
21. Cussenot, O., et al., *Hereditary prostate cancer and other genetic predispositions to prostate cancer*. Urol Int, 1998. **60 Suppl 2**: p. 30-4; discussion 35.
22. John Mendelsohn, M., Peter M. Howley, MD, Mark A. Israel, MD, Joe W. Gray, PhD, and Craig B., *The Molecular Basis of Cancer*, E. B.V., Editor. 2008. p. 721.
23. Selley, S., et al., *Diagnosis, management and screening of early localised prostate cancer*. Health Technol Assess, 1997. **1**(2): p. i, 1-96.
24. Heidenreich, A., *Consensus criteria for the use of magnetic resonance imaging in the diagnosis and staging of prostate cancer: not ready for routine use*. Eur Urol, 2011. **59**(4): p. 495-7.
25. Lastraioli, E., J. Iorio, and A. Arcangeli, *Ion channel expression as promising cancer biomarker*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1848**(10 Pt B): p. 2685-702.
26. Prevarskaya, N., et al., *Ion channels in death and differentiation of prostate cancer cells*. Cell Death and Differentiation, 2007. **14**(7): p. 1295-304.
27. Belkacemi, L., et al., *Calcium channels, transporters and exchangers in placenta: a review*. Cell Calcium, 2005. **37**(1): p. 1-8.
28. Parekh, A.B. and J.W. Putney, Jr., *Store-operated calcium channels*. Physiol Rev, 2005. **85**(2): p. 757-810.
29. Gueguinou, M., et al., *KCa and Ca(2+) channels: the complex thought*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(10): p. 2322-33.
30. Cullen, P.J. and P.J. Lockyer, *Integration of calcium and Ras signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(5): p. 339-48.
31. Monteith, G.R., et al., *Calcium and cancer: targeting Ca2+ transport*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(7): p. 519-30.
32. Berridge, M.J., M.D. Bootman, and H.L. Roderick, *Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(7): p. 517-29.
33. Catterall, W.A., *Voltage-Gated Calcium Channels*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2011. **3**(8).
34. Fiorio Pla, A. and L. Munaron, *Functional properties of ion channels and transporters in tumour vascularization*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2014. **369**(1638): p. 20130103.
35. Cheng, K.T., et al., *Contribution and regulation of TRPC channels in store-operated Ca2+ entry*. Curr Top Membr, 2013. **71**: p. 149-79.
36. Shapovalov, G., R. Skryma, and N. Prevarskaya, *Calcium channels and prostate cancer*. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2013. **8**(1): p. 18-26.
37. Lee, J.M., et al., *Ion channels and transporters in cancer. 4. Remodeling of Ca(2+) signaling in tumorigenesis: role of Ca(2+) transport*. Am J Physiol Cell Physiol, 2011. **301**(5): p. C969-76.
38. Lacinova, L., *Voltage-Dependent calcium channels*. Gen Physiol Biophys., 2005. **1**: p. 1-78.
39. BERGSMAN, J.B., *Classification and Function of Voltage-Gated Calcium Channels* Springer, 2000: p. 45.
40. Mahapatra, S., et al., *Calcium channel types contributing to chromaffin cell excitability, exocytosis and endocytosis*. Cell Calcium, 2012. **51**(3-4): p. 321-30.
41. Taylor, J.T., et al., *Calcium signaling and T-type calcium channels in cancer cell cycling*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(32): p. 4984-91.
42. Lory, P., I. Bidaud, and J. Chemin, *T-type calcium channels in differentiation and proliferation*. Cell Calcium, 2006. **40**(2): p. 135-46.

43. Park, J.-Y., *Modulation of Cav3.2 T-type Ca²⁺ channels by protein kinase C*. Modulation of Cav3.2 T-type Ca²⁺ channels by protein kinase C, 2003. **547**(1-3): p. 37-42.
44. Wang, X.T., et al., *The mRNA of L-type calcium channel elevated in colon cancer: protein distribution in normal and cancerous colon*. American Journal of Pathology, 2000. **157**(5): p. 1549-62.
45. Zhang, Y., et al., *Inhibition of T-type Ca²⁺ channels by endostatin attenuates human glioblastoma cell proliferation and migration*. British Journal of Pharmacology, 2012. **166**(4): p. 1247-1260.
46. Huc, S., et al., *Regulation of T-type calcium channels: signalling pathways and functional implications*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(6): p. 947-52.
47. Panner, A. and R.D. Wurster, *T-type calcium channels and tumor proliferation*. Cell Calcium, 2006. **40**(2): p. 253-9.
48. Li, Y., et al., *A role of functional T-type Ca²⁺ channel in hepatocellular carcinoma cell proliferation*. Oncology Reports, 2009. **22**(5): p. 1229-35.
49. Heo, J.H., et al., *T-type Ca²⁺ channel blockers suppress the growth of human cancer cells*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2008. **18**(14): p. 3899-901.
50. Panner, A., et al., *Variation of T-type calcium channel protein expression affects cell division of cultured tumor cells*. Cell Calcium, 2005. **37**(2): p. 105-119.
51. Senatore, A., *Cav3 T-type calcium channels*. Advance Review, 2012. **1**: p. 25.
52. Toyota, M., et al., *Inactivation of CACNA1G, a T-type calcium channel gene, by aberrant methylation of its 5' CpG island in human tumors*. Cancer Research, 1999. **59**(18): p. 4535-41.
53. Castro, M., et al., *Multiplexed methylation profiles of tumor suppressor genes and clinical outcome in lung cancer*. J Transl Med, 2010. **8**: p. 86.
54. Ohkubo, T. and J. Yamazaki, *T-type voltage-activated calcium channel Cav3.1, but not Cav3.2, is involved in the inhibition of proliferation and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells*. Int J Oncol, 2012. **41**(1): p. 267-75.
55. Gackiere, F., et al., *CaV3.2 T-type calcium channels are involved in calcium-dependent secretion of neuroendocrine prostate cancer cells (vol 283, pg 10162, 2008)*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(28): p. 19872-19872.
56. Mariot, P., et al., *Overexpression of an alpha 1H (Cav3.2) T-type calcium channel during neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(13): p. 10824-33.
57. Feldman, B.J. and D. Feldman, *The development of androgen-independent prostate cancer*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(1): p. 34-45.
58. Fukami, K., et al., *Functional upregulation of the H2S/Cav3.2 channel pathway accelerates secretory function in neuroendocrine-differentiated human prostate cancer cells*. Biochem Pharmacol, 2015. **97**(3): p. 300-9.
59. Weaver, E.M., et al., *Regulation of T-type calcium channel expression by sodium butyrate in prostate cancer cells*. Eur J Pharmacol, 2015. **749**: p. 20-31.
60. Diaz, L., et al., *Estrogens and human papilloma virus oncogenes regulate human ether-a-go-go-1 potassium channel expression*. Cancer Res, 2009. **69**(8): p. 3300-7.
61. Wang, Z., *Roles of K⁺ channels in regulating tumour cell proliferation and apoptosis*. Pflugers Arch, 2004. **448**(3): p. 274-86.
62. Pardo, L.A., et al., *Role of voltage-gated potassium channels in cancer*. J Membr Biol, 2005. **205**(3): p. 115-24.
63. Rybalchenko, V., et al., *Verapamil inhibits proliferation of LNCaP human prostate cancer cells influencing K⁺ channel gating*. Mol Pharmacol, 2001. **59**(6): p. 1376-87.

64. Skryma, R.N., et al., *Potassium conductance in the androgen-sensitive prostate cancer cell line, LNCaP: involvement in cell proliferation*. Prostate, 1997. **33**(2): p. 112-22.
65. Abdul, M. and N. Hoosein, *Expression and activity of potassium ion channels in human prostate cancer*. Cancer Letters, 2002. **186**(1): p. 99-105.
66. Jenke, M., et al., *C-terminal domains implicated in the functional surface expression of potassium channels*. EMBO J, 2003. **22**(3): p. 395-403.
67. Napp, J., et al., *Glycosylation of Eag1 (Kv10.1) potassium channels: intracellular trafficking and functional consequences*. J Biol Chem, 2005. **280**(33): p. 29506-12.
68. Bauer, C.K. and J.R. Schwarz, *Physiology of EAG K⁺ channels*. J Membr Biol, 2001. **182**(1): p. 1-15.
69. Camacho, J., et al., *Cytoskeletal interactions determine the electrophysiological properties of human EAG potassium channels*. Pflugers Arch, 2000. **441**(2-3): p. 167-74.
70. Rodríguez-Rasgado, A.a.-M.a.a.C., *Eag1 Channels as potential Cancer Biomarkers*. Sensors, 2012. **12**: p. 5986-5995.
71. Pardo, L.A., et al., *Oncogenic potential of EAG K(+) channels*. EMBO J, 1999. **18**(20): p. 5540-7.
72. Camacho, J., *Ether a go-go potassium channels and cancer*. Cancer Lett, 2006. **233**(1): p. 1-9.
73. Farias, L.M., et al., *Ether a go-go potassium channels as human cervical cancer markers*. Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 6996-7001.
74. CS, O., *Eag1 potassium channels as markers of cervical dysplasia*. Oncol Rep, 2011.
75. al., C.-L.e., *Astemizole-based anticancer therapy for hepatocellular carcinoma (HCC), and Eag1 channels as potential early-stage markers of HCC*. tumor Biology, 2015. **36**(8): p. 6149-6158.
76. Ousingsawat, J., et al., *Expression of voltage-gated potassium channels in human and mouse colonic carcinoma*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(3): p. 824-31.
77. Weber, C., et al., *Silencing the activity and proliferative properties of the human Eag1 Potassium Channel by RNA Interference*. J Biol Chem, 2006. **281**(19): p. 13030-7.
78. ST, M., *Frequent aberrant expression of the human ether à go-go (hEAG1) potassium channel in head and neck cancer: pathobiological mechanisms and clinical implications*. J Mol Med (Berl), 2012. **10**.
79. Avila, E., et al., *Calcitriol down-regulates human ether a go-go 1 potassium channel expression in cervical cancer cells*. Anticancer Res, 2010. **30**(7): p. 2667-72.
80. Downie, B.R., et al., *Eag1 expression interferes with hypoxia homeostasis and induces angiogenesis in tumors*. J Biol Chem, 2008. **283**(52): p. 36234-40.
81. al., M.H.e., *Human Ether a`-gogo KR Channel 1 (hEag1) Regulates MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Migration Through Orai1-Dependent Calcium Entry*. J. Cell Physiology, 2012. **227**: p. 3837-3846.
82. Lin, H., et al., *Transcriptional and post-transcriptional mechanisms for oncogenic overexpression of ether a go-go K⁺ channel*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e20362.
83. Borowiec, A.S., et al., *IGF-1 activates hEAG K(+) channels through an Akt-dependent signaling pathway in breast cancer cells: role in cell proliferation*. J Cell Physiol, 2007. **212**(3): p. 690-701.
84. X, W., *p38 MAPK regulates the expression of ether à go-go potassium channel in human osteosarcoma cells*. Radiol Oncol, 2013. **47**(1).
85. Garcia-Quiroz, J., et al., *Astemizole synergizes calcitriol antiproliferative activity by inhibiting CYP24A1 and upregulating VDR: a novel approach for breast cancer therapy*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e45063.
86. Garcia-Ferreiro, R.E., et al., *Mechanism of block of hEag1 K⁺ channels by imipramine and astemizole*. J Gen Physiol, 2004. **124**(4): p. 301-17.
87. de Guadalupe Chavez-Lopez, M., et al., *Antiproliferative and proapoptotic effects of astemizole on cervical cancer cells*. Int J Gynecol Cancer, 2014. **24**(5): p. 824-8.

88. Garcia-Quiroz, J., et al., *In vivo dual targeting of the oncogenic Ether-a-go-go-1 potassium channel by calcitriol and astemizole results in enhanced antineoplastic effects in breast tumors*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 745.
89. Hemmerlein, B., et al., *Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours*. Mol Cancer, 2006. **5**: p. 41.
90. Zheng, Y.Q., et al., *[Expression of Eag1 K(+) channel in prostate cancer and its significance]*. Zhonghua Nan Ke Xue, 2013. **19**(3): p. 205-9.
91. Hartung, F., W. Stuhmer, and L.A. Pardo, *Tumor cell-selective apoptosis induction through targeting of K(V)10.1 via bifunctional TRAIL antibody*. Mol Cancer, 2011. **10**: p. 109.
92. Webber, M.M., et al., *Human cell lines as an in vitro/in vivo model for prostate carcinogenesis and progression*. Prostate, 2001. **47**(1): p. 1-13.
93. Schonherr, R., *Clinical relevance of ion channels for diagnosis and therapy of cancer*. J Membr Biol, 2005. **205**(3): p. 175-84.
94. Fraser, S.P. and L.A. Pardo, *Ion channels: functional expression and therapeutic potential in cancer - Colloquium on ion channels and cancer*. Embo Reports, 2008. **9**(6): p. 512-515.
95. Mariot, P., et al., *Overexpression of an alpha 1H (Cav3.2) T-type calcium channel during neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(13): p. 10824-33.
96. Gackiere, F., et al., *Functional coupling between large-conductance potassium channels and Cav3.2 voltage-dependent calcium channels participates in prostate cancer cell growth*. Biol Open, 2013. **2**(9): p. 941-51.
97. Huang, J.B., et al., *Identification of channels promoting calcium spikes and waves in HT1080 tumor cells: Their apparent roles in cell motility and invasion*. Cancer Research, 2004. **64**(7): p. 2482-2489.
98. Weaver, E.M., et al., *Posttranscriptional regulation of T-type Ca(2+) channel expression by interleukin-6 in prostate cancer cells*. Cytokine, 2015. **76**(2): p. 309-20.
99. Pardo, L.A., et al., *Approaches targeting K(V)10.1 open a novel window for cancer diagnosis and therapy*. Curr Med Chem, 2012. **19**(5): p. 675-82.
100. Restrepo-Angulo, I., C. Sanchez-Torres, and J. Camacho, *Human EAG1 potassium channels in the epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer cells*. Anticancer Res, 2011. **31**(4): p. 1265-70.
101. Villalonga, N., et al., *Potassium channels are a new target field in anticancer drug design*. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2007. **2**(3): p. 212-23.
102. Kohl, T., et al., *Rapid internalization of the oncogenic K+ channel K(V)10.1*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26329.
103. Urrego, D., et al., *Potassium channels in cell cycle and cell proliferation*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2014. **369**(1638): p. 20130094.
104. Urrego-Blanco, *Dynamics of Kv10.1 expression through the cell cycle of cancer and non-cancer cells*, in *Faculty of Biology*. 2014, Georg August Universität Göttingen: Göttingen, Germany.
105. Pardo, L.A., *Voltage-gated potassium channels in cell proliferation*. Physiology (Bethesda), 2004. **19**: p. 285-92.
106. Gomez-Ospina, N., et al., *The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel Ca(V)1.2 encodes a transcription factor*. Cell, 2006. **127**(3): p. 591-606.
107. Garcia-Becerra, R., et al., *Calcitriol inhibits Ether-a go-go potassium channel expression and cell proliferation in human breast cancer cells*. Exp Cell Res, 2010. **316**(3): p. 433-42.
108. Chen, Y., et al., *Functional K(v)10.1 channels localize to the inner nuclear membrane*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e19257.

109. Rodriguez-Rasgado, J.A., I. Acuna-Macias, and J. Camacho, *Eag1 channels as potential cancer biomarkers*. *Sensors (Basel)*, 2012. **12**(5): p. 5986-95.
110. Sun, X.X., S.L. Bostrom, and L.C. Griffith, *Alternative splicing of the eag potassium channel gene in Drosophila generates a novel signal transduction scaffolding protein*. *Mol Cell Neurosci*, 2009. **40**(3): p. 338-43.
111. Garcia-Quiroz, J. and J. Camacho, *Astemizole: an old anti-histamine as a new promising anti-cancer drug*. *Anticancer Agents Med Chem*, 2011. **11**(3): p. 307-14.
112. de Guadalupe Chavez-Lopez, M., et al., *Astemizole-based anticancer therapy for hepatocellular carcinoma (HCC), and Eag1 channels as potential early-stage markers of HCC*. *Tumour Biol*, 2015. **36**(8): p. 6149-58.
113. Jakhar, R., et al., *Astemizole-Histamine induces Beclin-1-independent autophagy by targeting p53-dependent crosstalk between autophagy and apoptosis*. *Cancer Lett*, 2016. **372**(1): p. 89-100.
114. Hammadi, M., et al., *Human ether a-gogo K(+) channel 1 (hEag1) regulates MDA-MB-231 breast cancer cell migration through Orai1-dependent calcium entry*. *J Cell Physiol*, 2012. **227**(12): p. 3837-46.