

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID y CSIC

Facultad de Medicina

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología

Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM)



***Estudio electrofisiológico de los canales
herg en células tumorales de colon***

Memoria del trabajo de investigación para optar al Título de Máster en Investigación
Biomédica presentado por

Alejandra Granja Del Río

Tutores:

Miriam Hernández Morales

Carlos Villalobos Jorge

Lucía Núñez Llorente

Valladolid, 2013

Índice

I.	Introducción.....	3
1.1.	El cáncer:	4
1.2.	Características de las células cancerígenas:	4
1.3.	La proliferación y los canales iónicos:	5
1.4.	Canales de K^+ :	6
1.4.1.	Canales de K^+ operados por voltaje:	7
1.5.	Canales de K^+ operados por voltaje: la familia EAG (ether à-go-go):	8
1.6.	Los canales herg:	9
1.7.	Los canales herg y el cáncer:	10
II.	Hipótesis y objetivos	12
III.	Materiales y métodos	14
3.1.	Materiales.....	15
3.2.	Métodos	15
3.2.1.	Cultivos celulares:	15
3.2.2.	Suspensión celular para registro electrofisiológico:	15
3.2.3.	Registros electrofisiológicos:.....	16
IV.	Resultados.....	18
4.1.	Corrientes iónicas operadas por voltaje en células de colon.	19
4.2.	Corrientes herg en células de colon.	20
4.3.	Corrientes herg en células HT29. Potencial de activación.	22
4.4.	Corrientes herg en células HT29. Inhibición por TEA.	25
4.5.	Corrientes herg en las células HT29: constante de tiempo de la desactivación.	26
V.	Discusión	29
VI.	Conclusiones	33
VII.	Bibliografía	35

I. Introducción

1.1. El cáncer:

El cáncer es una enfermedad multifactorial en la que las células tienen la habilidad de proliferar de manera crónica y descontrolada; también adquieren la capacidad de invadir otros tejidos, órganos y diseminarse por el organismo, lejos del lugar en el que se originaron y donde continúan creciendo; este proceso se conoce como metástasis (Hanahan y Weinberg, 2011; Onuigbo, 1975).

El cáncer es la principal causa de muerte en los países desarrollados. De los distintos tipos de cáncer el colorrectal tiene una alta incidencia con aproximadamente el 10% de los cánceres diagnosticados (“*World Cancer Research Fund International*”). Éste cáncer es de larga duración y actualmente su diagnóstico es posible porque se dispone de marcadores que permiten detectarlo y seguir su evolución desde las etapas iniciales (Hanahan y Weinberg, 2011; Taketo, 2012).

1.2. Características de las células cancerígenas:

En las células cancerígenas, multitud de procesos se ven alterados con respecto a las células normales, estas alteraciones otorgan a las células cancerígenas algunas características (**Figura 1**) que las definen y diferencian de las células normales (Hanahan y Weinberg, 2011):

- a) Pérdida de la inhibición por contacto.
- b) Resistencia a las señales inhibitorias del crecimiento.
- c) Resistencia a la muerte celular.
- d) Potencial ilimitado de replicación.
- e) Angiogénesis (desarrollo de la vascularización o sistema de irrigación).
- f) Invasión y metástasis.
- g) Alta inestabilidad genómica.
- h) Reclutamiento de células y factores que favorecen un estado de inflamación crónico.
- i) Evasión de la destrucción por el sistema inmune.
- j) Reprogramación del metabolismo energético.
- k) Autonomía proliferativa.

La capacidad de proliferar de manera crónica y descontrolada es la característica fundamental que define las células cancerígenas. El ciclo celular está formado por una serie de etapas (G1, S, G2 y M) coordinadas y reguladas que aseguran la integridad del ADN. Éste proceso conduce a la proliferación y la división celular. En células normales el ciclo celular está finamente regulado mientras que en células cancerígenas tienen alterada la regulación y modulación de este ciclo (Alberts, 2010). Además, las células normales tienen un número limitado de ciclos de crecimiento y división determinados por los telómeros; éstos se encuentran en los extremos de los cromosomas y cada vez que la célula se replica su longitud disminuye limitando las veces que puede dividirse. Los telómeros son sintetizados por la telomerasa (una DNA polimerasa) que en células normales no se expresa pero sí lo hace en las células cancerosas lo que les permite adquirir la capacidad ilimitada de replicarse. Las células normales mantienen la homeostasis y la arquitectura de los tejidos gracias al control estricto de producción y liberación de factores que promueven

y regulan la progresión del ciclo celular y su proliferación. En cambio, las células cancerígenas promueven su proliferación al producir de forma exacerbada factores de crecimiento que actúan sobre ellas mismas (secreción autocrina), al enviar señales a células normales para que liberen más factores de crecimiento (Bhowmick et al., 2004; Cheng et al., 2008), activando de forma crónica vías de señalización intracelular, o sobreexpresando receptores para estos factores. Por otro lado, en las células normales hay una retroalimentación negativa que detiene las cascadas de señalización activadas por los factores de crecimiento, sin embargo, las células cancerosas son resistentes a estas señales de inhibición del crecimiento (Wertz y Dixit, 2013). Finalmente, el ciclo celular normal también está regulado y modulado por canales iónicos, principalmente de Ca^{2+} y de K^+ . Éstos canales permiten la activación de otras proteínas (canales iónicos o proteínas intracelulares) que favorecen y activan vías de señalización relacionadas con este ciclo y que en las células cancerígenas se ven alteradas, de forma que el ciclo celular deja de estar controlado (Hanahan y Weinberg, 2011).

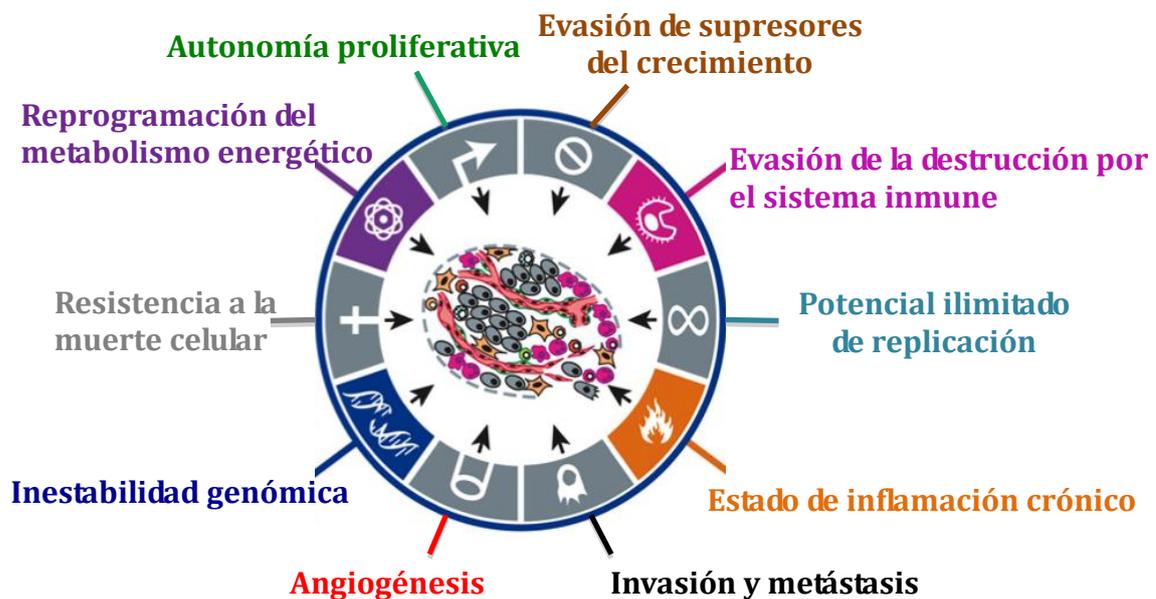


Figura 1. Características de las células cancerígenas. Modificado de Hanahan y Weinberg, 2011

1.3. La proliferación y los canales iónicos:

Los canales iónicos participan activamente en los procesos celulares, ya sea modificando las concentraciones de iones, la separación de cargas a un lado y otro de la membrana o bien porque un cambio conformacional en las proteínas que los forman da lugar a la activación de otras proteínas o vías de señalización. Por lo tanto, una alteración en su función, distribución o expresión (canalopatía), puede tener profundas consecuencias en la Fisiología Celular y contribuir a un gran número de enfermedades.

Los canales iónicos están formados por proteínas transmembranales que forman un poro hidrofílico por el que pasan selectivamente uno o más iones a favor de su gradiente electroquímico. Los canales iónicos se pueden abrir y cerrar en respuesta a diferentes estímulos: voltaje, temperatura, estímulos mecánicos, unión de ligandos, entre otros. Los canales iónicos pueden encontrarse en distintos estados conformacionales, los tres más importantes son: el estado abierto (cuando el canal permite el paso de iones), el estado cerrado (no permite el flujo de iones en ausencia del estímulo) y el estado inactivado (cuando aún

en presencia del estímulo, no permite el paso de iones) (Alberts, 2010; Lehninger, 2009). Los canales iónicos, según el ión que permean pueden ser: de Cl^- , de Na^+ , de Ca^{2+} y de K^+ . Éstos últimos se encuentran ampliamente distribuidos en el organismo e intervienen en numerosas funciones celulares.

En células normales y cancerígenas, los canales iónicos modulan la proliferación celular, participando en el ciclo celular a través de la generación de señales de Ca^{2+} , cambios del potencial de membrana y/o exocitosis de factores de crecimiento, y también al formar parte de complejos macromoleculares intracelulares. Éstos últimos se constituyen por el propio canal y por otras proteínas como son las integrinas (Becchetti, 2011).

Los canales iónicos selectivos para K^+ y para Ca^{2+} son principalmente los que intervienen en el ciclo celular.

- a) Canales de Ca^{2+} : El Ca^{2+} (que entra a la célula a través de los canales), entre otros cationes, participa en el ciclo celular, modulando la expresión y activación de factores de transcripción de las ciclinas y produciendo efectos directamente sobre las ciclinas, las ciclin-quinásas o proteínas asociadas.
- b) Canales de K^+ : Los canales de K^+ juegan un papel muy importante en la proliferación celular (Camacho, 2006) y la migración (Cuddapah y Sontheimer, 2011) porque son los principales responsables de mantener la membrana hiperpolarizada, que a su vez facilita la entrada de Ca^{2+} . Por lo anterior, pueden modular las señales de Ca^{2+} citosólico y adicionalmente regular y mantener el volumen celular, controlar la duración, forma y disparo de los potenciales de acción en células excitables (Korn y Trapani, 2005), contribuir al equilibrio osmótico, regular la actividad de las distintas vías metabólicas y también interactuar con los receptores de factores de crecimiento (Becchetti, 2011; Miller, 2000). De manera relevante, en las células cancerígenas hay una gran alteración en la expresión de los canales de K^+ tanto en la cantidad que se expresa como en los diferentes tipos. Este hecho ha llevado a proponer que los canales de K^+ facilitan el crecimiento de las células cancerosas (Becchetti, 2011; Camacho, 2006).

1.4. Canales de K^+ :

Los canales de K^+ , se clasifican en tres grandes familias: canales de K^+ de dos poros (2P; TWIK-1, TWIK-2, TASK-2) (Enyedi y Czirák, 2010; Korn y Trapani, 2005); canales de K^+ con rectificación hacia dentro (Kir; Kir1.x-7.x) (Hibino et al., 2010; Korn y Trapani, 2005) y canales de K^+ operados por voltaje (Kv; Kv1.x-12.x) (**Figura 2**).

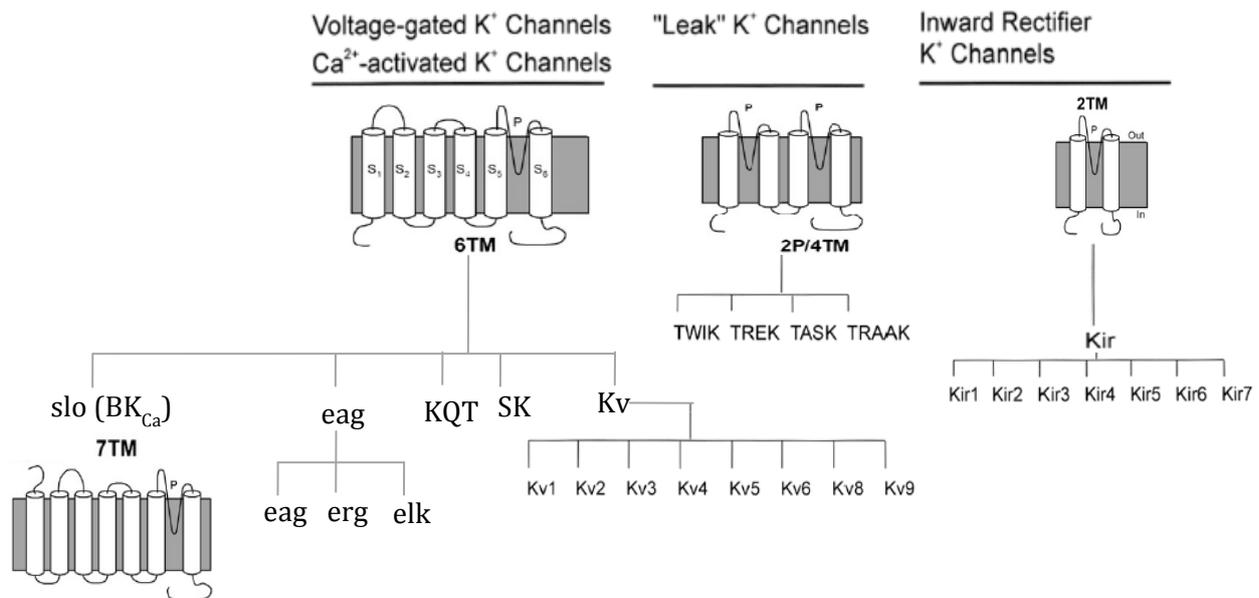


Figura 2. Clasificación de los canales de K^+ . Modificado de López-López y Pérez-García, 2007; Coetzee et al., 1999.

1.4.1. Canales de K^+ operados por voltaje:

Los Kv están formados por cuatro subunidades que forman un tetrámero. Cada subunidad tiene seis dominios transmembranales (S1-S6) y los extremos N-terminal y C-terminal se encuentran en el citosol (**Figura 3a**).

El segmento S4 es el dominio que detecta los cambios de voltaje de la membrana (despolarizaciones e hiperpolarizaciones) y en respuesta a una despolarización suficiente sufre un cambio conformacional que produce la apertura del canal (**Figura 3b**). Entre las hélices S5 y S6, se encuentra un bucle (dominio del poro, P) que conforma el filtro de selectividad para el ión K^+ y en la boca del canal hay aminoácidos con carga negativa que repelen los aniones.

Los Kv responden al estímulo de variaciones de voltaje con cambios conformacionales que son los responsables de sus propiedades y que dan lugar a los tres estados principales (**Figura 3c**):

- abierto o activado,
- cerrado o desactivado,
- inactivado.

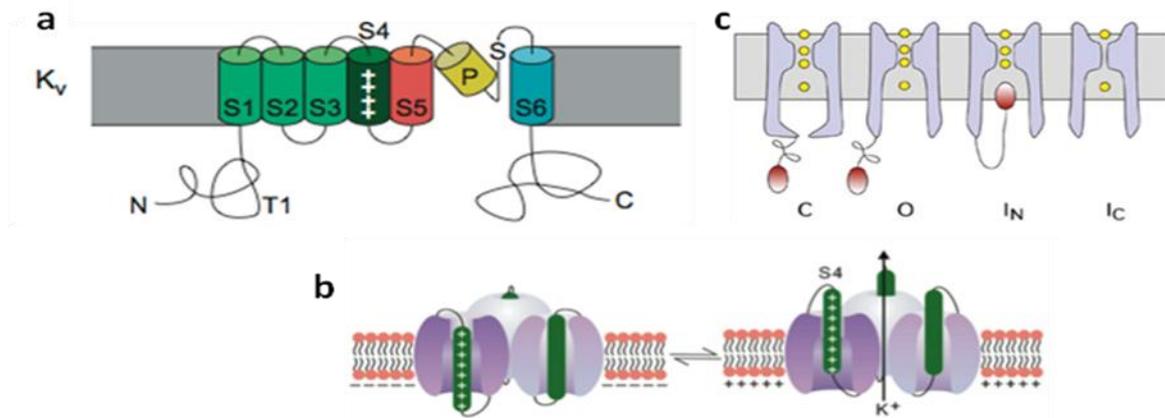


Figura 3. **a)** Representación esquemática de la topología de la subunidad que conforma los Kv (S1-S6, dominios transmembranales; N y C, terminales amino y carboxilo; P, dominio del poro). Tomado de Miller, 2000. **b)** Diagrama del movimiento del detector de voltaje en los Kv (S4, dominio transmembranal que detecta el voltaje de la membrana). Tomado de Miller, 2000. **c)** Esquema de los principales estados conformacionales (C, cerrado; o, abierto; I_N inactivación tipo N; I_C inactivación tipo C. Tomado de Korn y Trapani, 2005).

Éste último es un estado conformacional distinto del cerrado, pero desde el punto de vista eléctrico son indistinguibles. Existen dos mecanismos de inactivación en los Kv: la inactivación “tipo N” con una cinética más rápida, en la que en el extremo N-terminal de cada subunidad del tetrámero forma una “bola” que se une al canal a través de una cadena de aminoácidos (20 residuos aproximadamente) y que le bloquea (modelo de la bola y la cadena) (Miller, 2000) e inactivación “tipo C” con una cinética lenta, que implica cambios conformacionales de las cuatro subunidades del canal que se traducen en un estrechamiento del filtro de selectividad (Choi, et al., 1991; Korn y Trapani, 2005).

1.5. Canales de K⁺ operados por voltaje: la familia EAG (ether à-go-go):

De los canales de K⁺ que están expresados de manera anormal en las células cancerígenas, los más notables son los Kv de la familia EAG.

En 1969, se crearon mutantes de la mosca de la fruta “*Drosophila melanogaster*” al tratar a los machos adultos con metanosulfonato de etilo. Dichos mutantes presentaban movimientos de las patas lentos y rítmicos y al gen responsable de esto se le llamó “ether à-go-go” (Camacho, 2006; Ding et al., 2006). Posteriormente, se encontraron dos genes relacionados con el eag, los “eag-related gene (erg; gen relacionado con el eag) y los eag-like gene (elk; gen parecido a eag) (Warmke y Ganetzky, 1994). La familia eag está compuesta por dos miembros (eag1 y 2), la erg por tres (erg1, 2 y 3) y la elk por dos (elk1 y 2) (Bauer y Schwarz, 2001). Todos estos canales se expresan diferencialmente en el organismo.

La familia EAG, posee la misma estructura general que los Kv. Además poseen en el dominio N-terminal sitios de unión a calmodulina (CaM) y un dominio PAS (detector de oxígeno); en el dominio C-terminal también tiene dominios de unión a CaM, sitios para unir proteínas-quinasas dependientes de CaMII, y sitios de unión a nucleótidos cíclicos (Camacho, 2006; Rodríguez-Rasgado et al., 2012).

En tejido sano, la expresión de los canales eag1 está restringida al cerebro, mioblastos y placenta. Sorprendentemente en el cáncer, este canal aparece o su expresión está aumentada. Los canales eag1 se han encontrado, de forma nativa, en cáncer de ovario y de colon. Su asociación con el cáncer ha aumentado porque las células no cancerígenas transfectadas con este canal pueden crecer en ausencia de suero fetal bovino (esencial para la proliferación celular normal), perder la inhibición por contacto, aumentar la proliferación (Camacho, 2006; Rodríguez-Rasgado et al., 2012) e inducir tumores agresivos (Ding et al., 2006).

Los canales erg son más ubícuos, se encuentran en colon (músculo liso), útero, riñón, cerebro y corazón (Camacho, 2006; Huber, 2013; Vandenberg et al., 2012). Estos canales están relacionados con el ciclo de la célula y la transformación hacia un fenotipo cancerígeno, por lo que se ha propuesto que podrían ser dianas terapéuticas para el cáncer, así como marcadores para diagnosticar esta enfermedad. En el caso del cáncer colorrectal humano, se ha encontrado que el mRNA y la proteína de los canales erg se sobreexpresan en contraposición con el tejido normal donde no se expresa (Camacho, 2006; Huber, 2013).

1.6. Los canales herg:

Los canales erg (incluidos los encontrados en humanos, herg) son canales encargados de repolarizar la membrana después de un potencial de acción, tanto en células nerviosas como en los miocitos del corazón. En éste último órgano es donde más se han estudiado, ya que un defecto genético en este gen se ha asociado al síndrome LQT (Long QT Syndrome). También el uso de ciertos fármacos que bloquean este canal incrementan la probabilidad de padecer arritmias, muerte repentina e inducir el síndrome LQT. Por otro lado, ganancias de función de este canal dan lugar al síndrome SQT (short QT) y muerte súbita infantil (Asher et al., 2010; Grunnet et al., 2008; Piper et al., 2003; Vandenberg et al., 2012).

La subunidad proteica que forma el poro del canal herg está codificada por el gen KCNH2 de 33kb que se encuentra en el cromosoma 7. La proteína producto de este gen en sistemas heterólogos se conoce como Kv11.1. En sistemas nativos, esta proteína (herg) es la responsable del componente rápido de la corriente de K^+ de rectificación tardía (I_{Kr}).

- a) Proteínas asociadas a canales herg: Los herg cuentan con una serie de proteínas transmembranales accesorias como KCNQ1, KCNE1 y KCNE2 (MiRP1) (Isbrandt et al., 2002; Vandenberg et al., 2012) que modulan su corriente. Asimismo, la proteína KCR1 (con doce segmentos transmembranales) se puede asociar a los canales herg, haciéndoles menos sensibles a algunos inhibidores. Los herg tienen sitios específicos de fosforilación por proteín-quinasas A (PKA) (Cui et al., 2000; Vandenberg et al., 2012), B (PKB) (Zhang et al., 2003), C (PKC) (Cockerill et al., 2007; Vandenberg et al., 2012), PKG y tirosín-quinasas, que modulan la apertura (“gating”) del canal y también la endocitosis del mismo (Vandenberg et al., 2012).
- b) Gating: Los Kv11.1 son canales que pueden estar en, al menos, tres conformaciones abierta, cerrada o inactiva. La característica distintiva de los canales Kv11.1 es que su cinética de activación es mucho más lenta que la de inactivación (**Figura 4**); es decir, los herg se inactivan más rápidamente de lo que son capaces de activarse con despolarizaciones fuertes. Una vez que la membrana se repolariza, salen del estado de inactivación y después se desactivan lentamente. Estas

características les permiten acelerar la velocidad de repolarización de la membrana (vuelta al estado de reposo) (Korn y Trapani, 2005; Vandenberg et al., 2012).

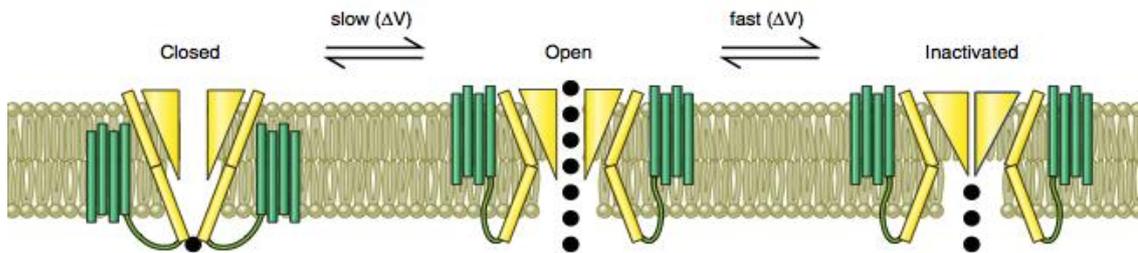


Figura 4. Esquema de los estados del canal hERG y su cinética de activación, inactivación y desactivación (cerrado). Tomado de Vandenberg et al., 2012.

En los canales hERG, los cambios de voltaje de la membrana son detectados por su dominio sensor (S4) que se mueve (**Figura 3b**) y produce la apertura (gating) del canal. Los residuos encargados de detectar las variaciones de voltaje son tres o cuatro aminoácidos cargados positivamente que se encuentran en la hélice S4 cuyas mutaciones cambian la dependencia con el voltaje de la apertura del canal (Subbiah et al., 2004; Vandenberg et al., 2012). El mecanismo de activación es tan lento (**Figura 4**) porque el movimiento del sensor de voltaje se produce lentamente (Smith y Yellen, 2002; Vandenberg et al., 2012), efecto determinado por la composición en algunos de los aminoácidos del S4 (Zhang et al., 2005; Vandenberg et al., 2012). Además, la activación está influida por factores externos, como aminoácidos que forman la unión entre el dominio S4 y el S5 (Vandenberg et al., 2012; Van Slyke et al., 2010). En cuanto al mecanismo de desactivación no se conoce bien por qué es lento; se cree que es debido a ciertos dominios en el lado intracelular que regulan la cinética de desactivación (Vandenberg et al., 2012). Finalmente, que la inactivación sea tan rápida se puede deber principalmente a su dependencia del voltaje; además puede contribuir el filtro de selectividad (Shönherr y Heinemann, 1996; Vandenberg et al., 2012) o de ciertos dominios (Dun et al., 1999; Vandenberg et al., 2012) como el extracelular que une S5 con el dominio del poro P (S5P) y que se ha observado que modulan la inactivación (Vandenberg et al., 2012).

1.7. Los canales hERG y el cáncer:

Se pueden observar grandes corrientes I_{Kr} durante las etapas del desarrollo embrionario así como en células des-diferenciadas (Claycomb et al., 1998; Vandenberg et al., 2012). Después, durante la etapa de maduración, los I_{Kr} son sustituidos por corrientes de rectificación hacia dentro (Crociani et al., 2000; Wang y Duff, 1996; Vandenberg et al., 2012). Los Kv en general, y particularmente los Kv11.1, participan en el ciclo celular así como en la regulación de la apoptosis (Dolderer et al., 2010) y en la proliferación tanto en el desarrollo embrionario como en el cáncer. En tejidos normales la expresión de hERG es baja o inexistente, en cambio en células cancerígenas existe una sobre-expresión.

Se ha encontrado el ARN mensajero del gen KCNH2 en células provenientes de cánceres como la leucemia, el cáncer de ovario, de pulmón, de mama y de colon, entre otros (Vandenberg et al., 2012). Además existe una relación estrecha entre la expresión de Kv11.1 y la capacidad de invasión y proliferación

de las células cancerígenas. En este sentido, en el cáncer de colon se ha observado que la expresión del Kv11.1 está relacionada con metástasis y un mal pronóstico (Lastraioli et al., 2004; Vandenberg et al., 2012). Por otro lado, los tumores sólidos se caracterizan por sobrevivir en hipoxia y ésta, mediante el dominio PAS, podría regular el gating y por tanto el funcionamiento de los mismos (Fontana et al., 2001; Vandenberg et al., 2012).

En numerosos modelos de cáncer (líneas celulares tumorales humanas) se ha encontrado una sobreexpresión de canales de la familia EAG como: células de cáncer de colon (HT29, HCT116 y T₈₄) (Chen et al., 2005; **Figura 5a y b**), células de adenocarcinoma mamario (SK-BR-3 y MCF-7) (**Figura 5c**), carcinoma de pulmón (A549) y muestras de cáncer de colon de pacientes (Ding et al., 2006). Es interesante que la inhibición farmacológica o mediante ARN de interferencia (Glassmeier et al., 2012) disminuye la proliferación (80% en HT29; Spitzner et al., 2007), y la capacidad de invasión y migración de estas células cancerígenas (Gong et al., 2010). Asimismo, estas estrategias promueven la apoptosis en estas líneas celulares (Gong et al., 2010).

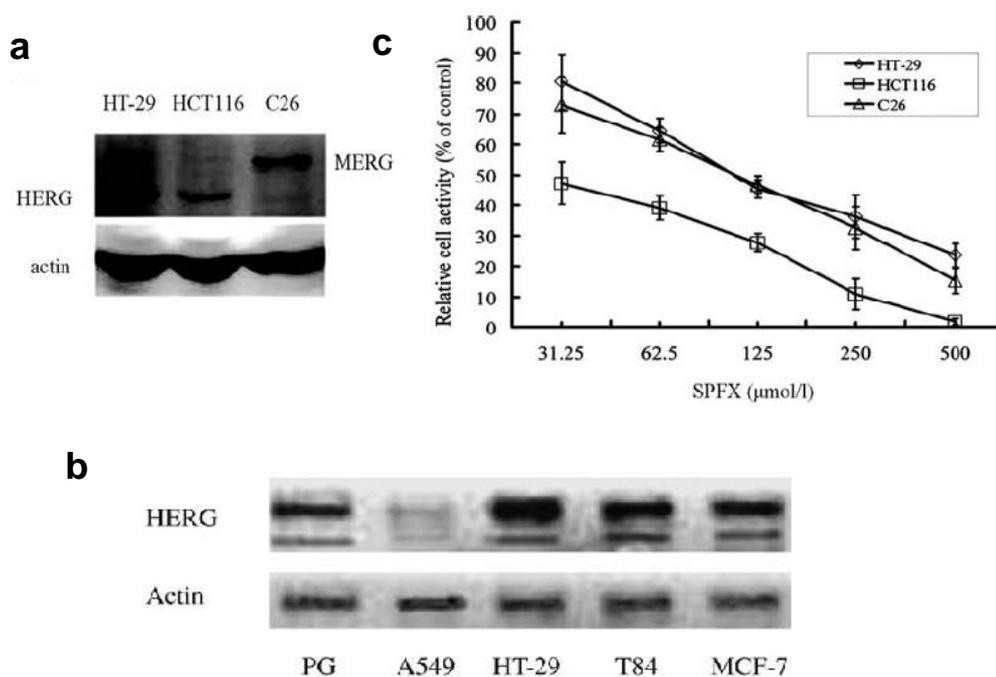


Figura 5. Expresión de la proteína herg en células tumorales, determinado por Western-blot (**a y b**). **c**) Relación entre la concentración de esparfloxacina (inhibidor de canales herg) y su efecto en la proliferación de las líneas celulares indicadas. a y c) Tomado de Gong et al., 2010. b) Tomado de Chen et al., 2005.

Finalmente, que la expresión del Kv11.1 en tejido sano sea mínima y que en células cancerígenas se vea incrementada, hacen de este canal una posible diana terapéutica y/o para el seguimiento del avance del cáncer y/o como posible diana terapéutica (Chen et al., 2005; Gong et al., 2010; Rodríguez-Rasgado et al., 2012).

II. Hipótesis y objetivos

En las células normales la expresión de los canales herg es limitada, restringiéndose principalmente a células excitables donde cumplen la función de repolarizar la membrana. En cambio, en las células cancerígenas (provenientes de cáncer de colon, de mama, uterino, de pulmón, entre muchos otros) la expresión de los canales herg aparece o se ve incrementada de forma considerable. En algunas células cancerígenas, su participación en la proliferación celular, migración e invasión está relacionada con su función como canal de potasio operado por voltaje; en cambio en otras, se debe a sus interacciones con proteínas intracelulares. Particularmente en el cáncer de colon, hay incremento de la expresión de canales herg de forma exacerbada tanto en líneas celulares humanas de este tipo de cáncer como en muestras obtenidas de pacientes.

Considerando los antecedentes descritos, planteamos la siguiente hipótesis:

Las células HT29 (modelo experimental de cáncer de colon) expresan canales herg funcionales en contraposición con las células de colon normales (NCM460).

Para comprobar la hipótesis se establecieron los siguientes objetivos:

- 1) Comparar las corrientes de membrana activadas por voltaje entre las células HT29 y las NCM460.
- 2) Investigar si las células HT29 y las NCM460 expresan corrientes herg.
- 3) Estudiar las características biofísicas (activación, recuperación de la inactivación e inactivación) de las corrientes herg en las células HT29.

III. Materiales y métodos

3.1. Materiales

Líneas celulares: células (HT29), derivadas de un adenocarcinoma colorrectal humano de grado I (EACC, 91072201), donada por el Dr. JC Fernández-Checa (CSIC, Barcelona, España); células NCM460, derivada de mucosa normal de un varón hispano de 68 años. El medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) y los suplementos: suero fetal bovino (FBS), L-glutamina, penicilina/estreptomicina, tripsina y PBS (sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}) se adquirieron de Lonza. El Detachin se adquirió de Gelantis.

Las sales usadas en el registro electrofisiológico fueron: NaCl, KCl, MgCl_2 , CaCl_2 , KF, glucosa, HEPES, EGTA y ATP- Na_2 adquiridas de MERCK y SIGMA-ALDRICH. El cloruro de tetraetilamonio y el astemizole fueron obtenidos de SIGMA-ALDRICH y TOCRIS, respectivamente.

3.2. Métodos

3.2.1. Cultivos celulares:

Las células HT29 se mantuvieron en crecimiento mediante la realización de subcultivos una vez por semana como se describe a continuación. Las células cultivadas en frascos de 25 cm^2 (NUNC) se lavan, una vez retirado el medio de cultivo, con 4 mL de medio tampón fosfato (PBS). Las células de naturaleza adherente, se despegan del fondo del frasco incubándolas con tripsina (1ml; 170 unidades/ml) durante 2 min a 37 °C. Después se neutraliza la enzima con 4 mL de DMEM (suplementado con 10 % de FBS, 0.2 mM de L-glutamina y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina) y se resuspenden hasta disociar los agregados celulares. La suspensión se centrifuga a 288 g durante 4 min, se decanta el sobrenadante y se resuspende el depósito celular con DMEM. Para mantener los cultivos se siembran 2×10^5 células, y para el registro $7-9 \times 10^5$ células en cada frasco. Los cultivos celulares se mantienen a 37 °C, 10 % de CO_2 y en un ambiente saturado de humedad.

3.2.2. Suspensión celular para registro electrofisiológico:

Las células HT29 se registran eléctricamente de 3 a 5 días después de subcultivarlas, considerando que alcancen entre el 80-90% de confluencia. Las células se lavan con 10 ml de PBS dos veces y después se despegan con 1 ml de Detachin, 2 min a 37 °C. A continuación, se añaden 9 mL de medio DMEM, se resuspenden lentamente hasta obtener células aisladas y se centrifugan a 128 g durante 2 min. Para los registros, las células se resuspenden en medio DMEM (suplementado) con una densidad celular de $5-10 \times 10^6$ células/mL.

3.2.3. Registros electrofisiológicos:

Las corrientes de K^+ de las células de colon (HT29 y NCM460) fueron registradas utilizando la técnica de “*patch-clamp*” con un equipo de registro planar (**Fig. 6**, Nanion Port-a-patch planar; Nanion Technologies, Munich, Alemania) en la configuración de “*whole-cell*” o célula completa. Las células en suspensión son registradas eléctricamente durante los 120 min siguientes después de ser levantadas. Los chips empleados para el registro eléctrico tenían una resistencia de 3-5 $M\Omega$ cuando se depositaba la solución de registro intracelular, la cual contenía (en mM): 50 KCl, 10 NaCl, 60 KF, 20 EGTA, 10 HEPES (pH ajustado a 7,2 con KOH). Como solución de registro externa se utilizaron: a) solución con K^+ normal (en mM) 141 NaCl, 4,7 KCl, 1,2 $MgCl_2$, 1,8 $CaCl_2$, 10 HEPES, 10 D-glucosa (pH ajustado a 7,4 con NaOH) y b) solución con K^+ alto (en mM) 100 NaCl, 40 KCl, 2 $MgCl_2$, 1 $CaCl_2$, 10 HEPES, 5 D-glucosa (pH ajustado a 7,4 con NaOH).

Cuando la resistencia del sello superaba el valor de 1G, se llevó la célula a configuración de célula completa o *whole-cell*. Inmediatamente después se midieron la capacitancia de la célula y la resistencia en serie. Estos valores se revisaron continuamente. Las corrientes de K^+ se adquirieron con un amplificador EPC-10 (HEKA). La diferencia de potencial entre las soluciones de registro (interna y externa) y las corrientes capacitativas transitorias se cancelaron con el sistema de compensación automático del amplificador (EPC10). Los registros se filtraron a una frecuencia de 10 kHz y se muestrearon a 5 kHz. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (20-25°C). Los datos se analizaron con el software Patchmaster (Nanion Technologies, Munich, Alemania) y MicrocalOrigin 7 (OriginLab, Ma, USA). Los resultados se muestran como la media \pm Error Estándar de la media (EEM). La comparación entre los grupos experimentales se realizó con la prueba estadística t-student, y se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $*p < 0.05$.

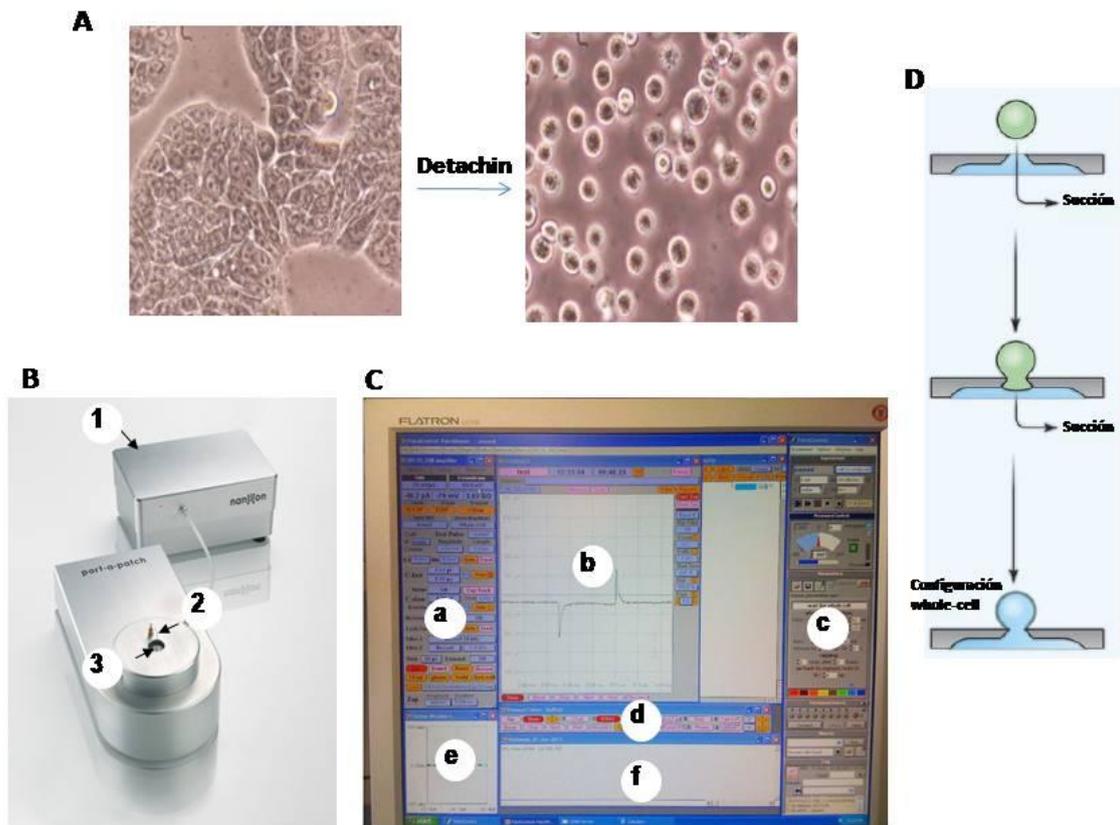


Figura 6. Sistema de registro electrofisiológico planar. (A) Fotografías de células HT29 en cultivo (izquierda) y en suspensión (derecha). (B) Componentes del equipo de registro planar: 1) unidad de succión, 2) electrodo de referencia, 3) chip de registro. (C) Pantalla de control del equipo de registro: a) amplificador, b) osciloscopio, c) comandos de las unidades de succión y perfusión, d) editor de protocolos, e) análisis en línea, f) cuaderno de registro. (D) Esquema representativo de los pasos seguidos para registros eléctricos en la configuración de célula completa.

IV. Resultados

4.1. Corrientes iónicas operadas por voltaje en células de colon.

Las corrientes de las células de colon normales y tumorales (NCM460 y HT29, respectivamente) fueron registradas mediante la técnica electrofisiológica de “patch-clamp” con el sistema de registro planar (Nanion Port-a-patch planar; Nanion Technologies, Múnich, Alemania). Los registros se obtuvieron en la configuración “whole-cell” (célula completa) y en el modo de fijación de voltaje. Las células NCM460 mostraron una capacitancia de 8.4 ± 1.1 pF (n=10) y las HT29 de 13.68 ± 1.93 pF (n=14).

Con el fin de observar las principales corrientes iónicas expresadas en las células de colon, se aplicaron pulsos de voltaje despolarizantes (respecto al voltaje de mantenimiento de -80 mV) de -60 a 60 mV (**Figura 7**). El potencial de equilibrio del potasio (E_K) correspondería a -80 mV. En ambos tipos de células, todos los pulsos activaron corrientes salientes (**Figura 7A, B**) que aumentaron su amplitud gradualmente con los pulsos más despolarizantes.

En las células NCM460, a potenciales más despolarizados que 20 mV las corrientes que se activaron aumentaron ligeramente su amplitud al final del pulso de voltaje. En cambio, a potenciales más hiperpolarizados que 20 mV las corrientes se mantuvieron constantes durante todo el pulso. Una vez que el voltaje regresó al de mantenimiento (-80 mV) la corriente regresó a niveles cercanos al basal (**Figura 7A**). En las células HT29, a potenciales más despolarizados que 0 mV, las corrientes salientes activadas aumentaron su amplitud hasta el final del pulso; mientras que, a potenciales más hiperpolarizados que 0 mV, la corriente se mantuvo constante. Cuando el voltaje volvió al de mantenimiento, se observó la activación de una corriente entrante (corriente de cola) que decayó rápidamente (**Figura 7B**).

Para estudiar con mayor detalle las corrientes generadas por los pulsos de voltaje, se obtuvieron las curvas corriente-voltaje (*I-V*). Éstas se construyeron graficando la amplitud de las corrientes, medidas al inicio y al final de cada pulso (normalizadas con respecto a la capacitancia de la célula), en función del voltaje de la membrana. En las células NCM460 y HT29 en el intervalo de voltaje examinado (-60 a 60 mV), no se observó el potencial de reversión de las corrientes. Además, en ambos tipos celulares, las curvas *I-V* para las corrientes iniciales no mostraron cambio significativo de la pendiente (que corresponde a la conductancia). En contraste, las curvas para las corrientes finales aumentaron significativamente la pendiente en los voltajes más despolarizantes (**Figura 7C, D**).

Considerando nuestras condiciones experimentales ($E_{K^+} = -80$ mV) y el perfil de las curvas *I-V* los resultados sugieren que tanto en las células NCM460 como en las HT29 las principales corrientes operadas por voltaje corresponden a corrientes de K^+ . La diferencia más relevante, al comparar las corrientes de las células normales y las tumorales fue que cuando se regresó a -80 mV, al final de los pulsos más despolarizantes, se activaron corrientes de cola únicamente en las células HT29, sugiriendo que estas células probablemente expresan corrientes herg, cuya característica biofísica que las distingue una corriente rápida durante la repolarización de la membrana, debido a la recuperación de la inactivación (Vandenberg et al., 2012).

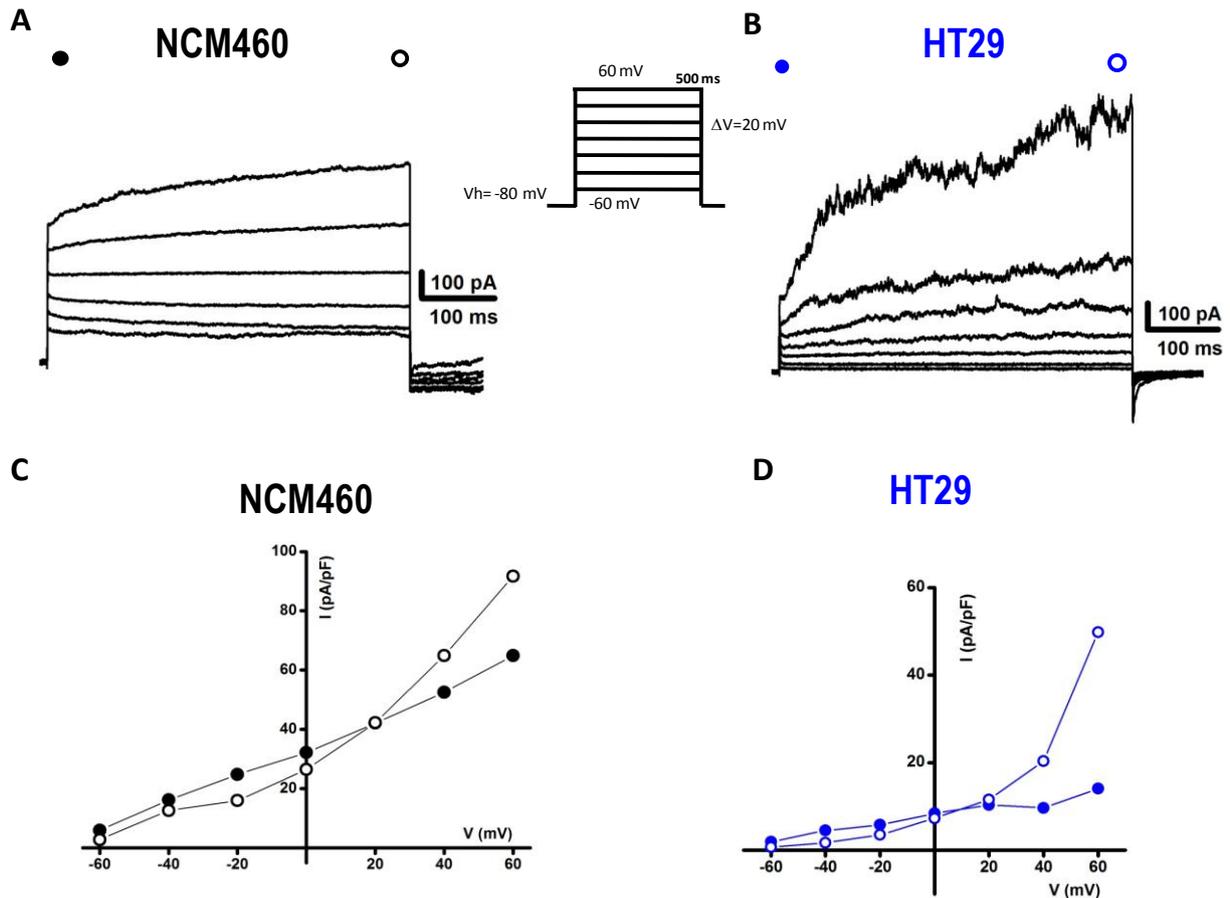


Figura 7. Corrientes operadas por voltaje en células de colon. Corrientes generadas por pulsos de -60 a +60 mV (**Inserto**) en células normales (NCM460; **A**) y tumorales (HT29; **B**). (**C**, **D**) Relaciones corriente-voltaje (*I-V*) obtenidas de los experimentos **A** y **B**. En esta y en las siguientes figuras los círculos sólidos y las circunferencias corresponden a la corriente al inicio y al final del pulso P1, respectivamente; en células NCM460 (negro) y en HT29 (azul). Nótese la corriente de cola en las HT29 cuando se regresa al voltaje de mantenimiento.

4.2. Corrientes herg en células de colon.

A continuación, para corroborar la presencia de corrientes herg en las células tumorales y su ausencia en las normales, se utilizó una estrategia experimental que optimiza las condiciones para activar estas corrientes: se aumentó el K^+ extracelular a 40 mM ($E_{K^+} = -25$ mV) y el voltaje de mantenimiento a -20 mV. El protocolo de estímulos eléctricos consistió en dos pulsos: el primero (P1) una serie de -120 a 30 mV y el segundo (P2) repolarizó la membrana hasta -100 mV (**Figura 8**). En las células normales y tumorales, el P1 generó corrientes salientes en potenciales más despolarizantes que -20 mV y corrientes entrantes en potenciales más hiperpolarizantes que -20 mV (**Figura 8A y B**).

En las células normales examinadas, las corrientes salientes y entrantes se mantuvieron constantes durante la duración del pulso de voltaje. Además, en la curva $I-V$ promedio de las células NCM460 (n=8) se observó una rectificación saliente (aumento de la pendiente a voltajes más positivos) y como se esperaba, la corriente cambió su dirección en potenciales cercanos al potencial de equilibrio del K^+ (**Figura 8C**) alrededor de -25 mV. Las corrientes al inicio y al final de cada pulso tuvieron una amplitud similar, por ejemplo (a 30 mV la corriente inicial fue de 59.0 ± 8.9 pA/pF y la final de 52 ± 8 pA/pF n=8).

En las células HT29 entre -120 y -20 mV, al inicio de P1 se observaron corrientes entrantes que decayeron rápidamente hasta un nivel más o menos constante que se mantuvo hasta el final del pulso de voltaje (**Figura 8B, arriba**). Además, las corrientes generadas por la repolarización de la membrana (P2) revelaron corrientes de cola muy prominentes (**Figura 8B, abajo**). Cuanto más despolarizante fue el P1, mayor fue la amplitud de la corriente de cola, alcanzando el máximo con el P1 a 30 mV. Tanto la corriente, al inicio de P1, como la de cola, mostraron forma de “gancho”. Esto se debe a una recuperación de la inactivación de los canales herg, seguidos del decaimiento rápido de la corriente. Es conocido que éste decaimiento puede deberse a la suma de la inactivación y desactivación de los canales herg, propiedades que los distinguen, de entre otros canales de K^+ operados por voltaje. Para la corriente de cola del pulso más despolarizante se calculó el tiempo de decaimiento que se ajustó a la suma de dos exponenciales de la forma $I = e^{-\frac{V}{\tau_1}} + e^{-\frac{V}{\tau_2}}$ (no mostrado). Los valores para las constantes de tiempo obtenidas (τ) fueron $\tau_1 = 93 \pm 18$ ms y $\tau_2 = 9 \pm 4$ ms (n=5).

En las células HT29, las corrientes salientes máximas, en el intervalo de voltaje examinado se alcanzaron a 30 mV: la amplitud de las corrientes al inicio fue de 43 ± 10 pA/pF (n=5) y la del final fue de 56 ± 19 pA/pF). Además, las curvas $I-V$ promedio para las corrientes generadas por el P1 tuvieron un potencial de inversión en torno a -20 mV, y fueron parecidas en los voltajes más positivos que este potencial. Sin embargo, en el intervalo entre -120 y -40 mV, la amplitud de corriente entrante al inicio fue notablemente mayor con respecto a la del final del pulso (**Figura 8D**). La amplitud de las corrientes generadas por el pulso P2, se graficaron con respecto al voltaje del P1 previo. La amplitud de la corriente de cola se obtuvo ajustando el componente de decaimiento de la corriente a una función exponencial con dos constantes y extrapolando al tiempo $t=0$, es decir, al inicio de P2, pulso repolarizante. En las células NCM460 las corrientes tuvieron una amplitud que prácticamente no varió (**Figura 8E**); mientras que, en las células HT29 la amplitud de la corriente de cola aumentó mientras más despolarizante fue el pulso previo (P1) (**Figura 8F**) (n=5). Con P1=30 mV la corriente de cola fue de -111 ± 44 pA/pF. Estos resultados sugieren que, aparentemente, las células NCM460 no expresan corrientes herg. En cambio, las células HT29 mostraron corrientes de cola cuyas características son similares a las descritas para las herg (Vandenberg, 2012), es decir, activación lenta, inactivación rápida, y de manera sobresaliente, se activan al repolarizar la membrana.

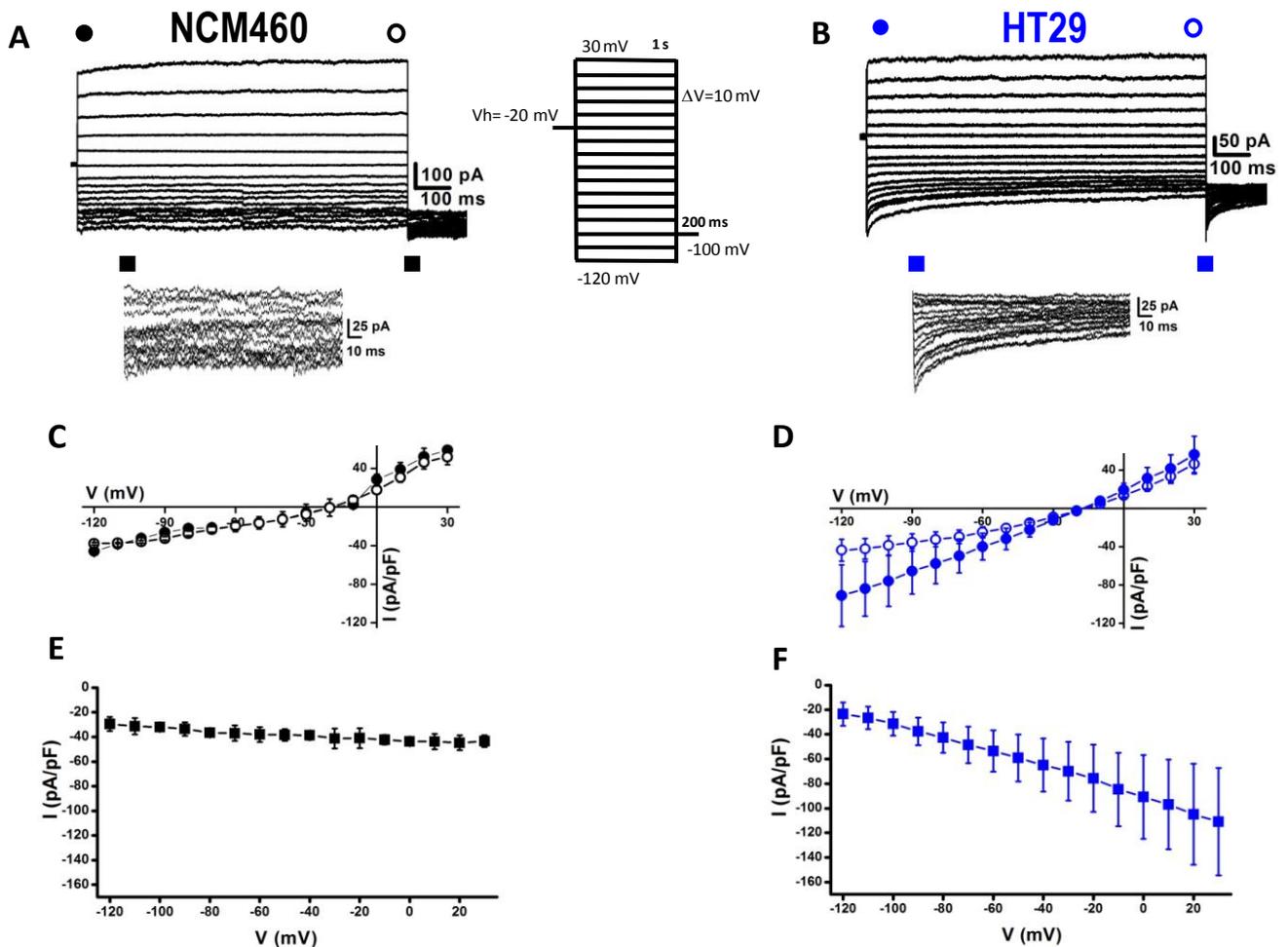


Figura 8. Corrientes herg en células de colon. Ejemplo de corrientes generadas por pulsos de -120 a 30 mV y posterior repolarización a -100 mV (inserto) en células NCM460 (A) y HT29 (B). Abajo, las corrientes generadas al repolarizar la membrana ampliadas. (C, D) Relaciones $I-V$ promedio \pm Error Estándar (EE) ($n=8$, NCM460; $n=5$, HT29), para las corrientes al inicio y al final de P1 obtenidas de experimentos como los mostrados en A y B. Relaciones $I-V$ de las corrientes de cola medidas al inicio de la repolarización en células NCM460 (E) y en HT29 (F).

4.3. Corrientes herg en células HT29. Potencial de activación.

Una vez que se hubieron identificado corrientes parecidas a las herg en las células tumorales, a continuación se examinaron algunas de sus propiedades electrofisiológicas, cinéticas y farmacológicas para corroborar su identidad.

Para estimar el voltaje al cual se activa la mitad de la corriente herg ($V_{0.5}$), se utilizó un protocolo formado por dos pulsos de voltaje: una serie de pulsos (P1) de -80 a 10 mV y después, el P2 en el que se llevó la membrana a -100 mV. El P1 nos permite, primeramente, activar las corrientes herg, y al final de este pulso (4s) tener una fracción de los canales herg inactivados, los cuales durante la repolarización (P2) se recuperan rápidamente de la inactivación (activación) y

observarla como corriente de cola. En esta serie de experimentos el E_{k+} y el de mantenimiento fueron de -80 mV.

Es importante notar que, en la mayoría de las células HT29 a las que se les aplicó este protocolo de pulsos de voltaje, se observó al inicio de P1 corriente pico con una activación muy rápida y posterior decaimiento que podría corresponder a los herg (Figura 9B, inserto).

En las células NCM460 y HT29 los pulsos P1 produjeron corrientes salientes (**Figura 9A, B**), cuyas curvas $I-V$ promedio ($n=8-13$) fueron muy parecidas cuando se comparaban las corrientes al inicio, y al final de los pulsos de voltaje así como entre los dos tipos de células (**Figura 9C, D**). Las corrientes salientes aumentaron gradualmente su amplitud con voltajes más despolarizantes, observándose mayor pendiente a partir de aproximadamente -30 mV. Como se esperaba, no se observó el potencial de inversión.

En contraste con las células NCM460 (**Figura 9A, abajo**), la repolarización a -100 mV después de cada pulso de voltaje generó, en las células HT29, una corriente de cola robusta (**Figura 9B, abajo**) que se activó rápidamente y después decayó lentamente hasta el final del pulso P2. La amplitud de la corriente de cola fue mayor cuanto más despolarizante fue el pulso previo (P1) (**Figura 9B, abajo**) con una amplitud máxima de -32 ± 7 pA/pF ($n=13$) con P1 a 10 mV. Las curvas $I-V$ promedio para las corrientes de cola reflejan su ausencia en las células NCM460 (**Figura 9C, cuadros**), en las que su amplitud se mantuvo más o menos sin cambios. En contraste, las corrientes de cola de las células HT29 incrementaron su amplitud cuanto más despolarizante era el pulso P1 previo (**Figura 9D, cuadros**).

Para apreciar mejor el efecto del voltaje del P1 sobre las corrientes de cola, éstas se normalizaron con respecto a la corriente máxima (obtenidas con P1=10 mV), y este valor se graficó con respecto al voltaje del pulso P1. Para las células NCM460, las corrientes normalizadas se mantuvieron prácticamente constantes sin importar el potencial de P1 (**Figura 9E**). En cambio, las corrientes de cola de las células HT29 incrementaron progresivamente su amplitud en función del voltaje del P1 previo, alcanzando el máximo para el P1=10 mV (**Figura 9F**).

La curva obtenida se ajustó a una función sigmoideal (Boltzmann):

$$I = \frac{1}{1 + e^{-\frac{(V-V_{0.5})}{s}}}$$

(**Figura 9F, línea gris**), con un coeficiente de correlación $r=0.99895$. Con los valores obtenidos del ajuste se estimó el $V_{0.5}$ que fue de -28 mV. Los resultados obtenidos confirman que las células NCM460 carecen de corrientes de cola. El $V_{0.5}$ estimado para las corrientes herg de las células HT29 (-28 mV) es muy cercano al reportado para corrientes de cola mediadas por canales herg (Sanguinetti et al., 1995; Su et al., 2009). Adicionalmente se observó la dependencia del voltaje de la corriente de cola cuando se recuperan de la inactivación.

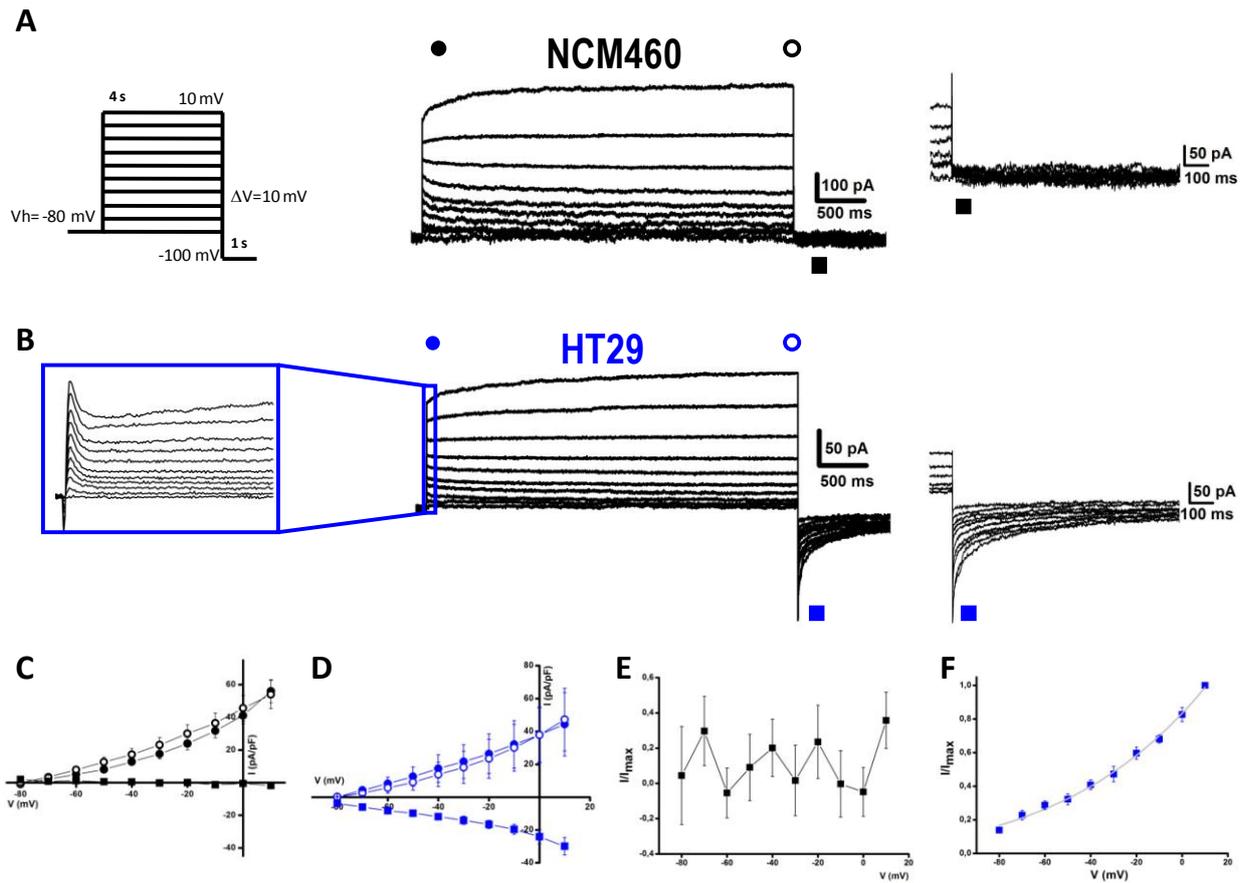


Figura 9. Potencial de activación de las corrientes hERG. Corrientes generadas por el protocolo de dos pulsos de voltaje (izquierda) en células NCM460 (**A**) y HT29 (**B**). A la derecha, las corrientes generadas al repolarizar la membrana a -100 mV ampliadas. (**C**, **D**) Relaciones I - V promedio \pm EE en células NCM460 (**C**; negro) y en células HT29 (**D**; azul) para las corriente al inicio y al final de P1, así como para las corrientes de cola. (**E**, **F**) Relaciones I - V promedio \pm EE ($n=8$, NCM460; $n=13$, HT29) obtenidas de las corrientes normalizadas con respecto a la corriente máxima obtenida a 10 mV.

4.4. Corrientes herg en células HT29. Inhibición por TEA.

Para corroborar farmacológicamente que las corrientes observadas en las células HT29 son corrientes de K^+ , se utilizó el TEA (cloruro de tetraetilamonio), un inhibidor de canales de K^+ de amplio espectro (Hille, 2001). Además, se ha mostrado que el TEA bloquea canales herg (Chimizu et al., 2003; Cho et al., 20011).

También para este caso, las condiciones experimentales fueron el voltaje de mantenimiento y el E_{K^+} de -80 mV. Las corrientes de K^+ se activaron con un protocolo de dos pulsos, como en la **Figura 9** en condiciones control, es decir, en solución de registro normal (**Figura 9B, izquierda**). Después, se expuso la célula al TEA (30 mM) y tras 2 minutos se aplicó el mismo protocolo de pulsos de voltaje. El TEA disminuyó significativamente las corrientes con respecto al control (**Figura 10A, derecha**). El mayor efecto se observó en la corriente al final del pulso P1 más despolarizante (10 mV) (**Figura 10B, izquierda**), donde el TEA bloqueó aproximadamente el 43% de la corriente. La corriente inhibida por TEA se obtuvo al restar la corriente en presencia de TEA de la corriente control (**Figura 10B, derecha**). La corriente generada por el P1 que fue inhibida por TEA, a 10 mV, fue una corriente saliente que no decayó en el intervalo de tiempo durante el que se mantuvo el pulso.

Las curvas $I-V$ de las corrientes generadas por P1 (al inicio y al final) control y en presencia de TEA (**Figura 10D, E**), muestran también su efecto inhibitor. El TEA disminuyó la amplitud de las corrientes en casi todos los voltajes examinados, siendo más notable en los potenciales más positivos. Además disminuyó la pendiente de las curvas $I-V$, es decir, su conductancia. Es importante resaltar que, la corriente de cola generada por la repolarización (P2), también fue bloqueada por el TEA (**Figura 10C**). Para las corrientes de cola (P2), el efecto del TEA se observó a partir de -20 mV, potencial que más o menos coincide con el de activación de las corrientes herg. El efecto más drástico se observó a 10 mV, en el que el TEA bloqueó aproximadamente el 40% de la corriente máxima (**Figura 10F**).

Estos resultados confirman que las corrientes de las células HT29 corresponden a corrientes de potasio K^+ , tanto las generadas por pulsos despolarizantes (P1) como las de cola, puesto que son inhibidas con TEA.

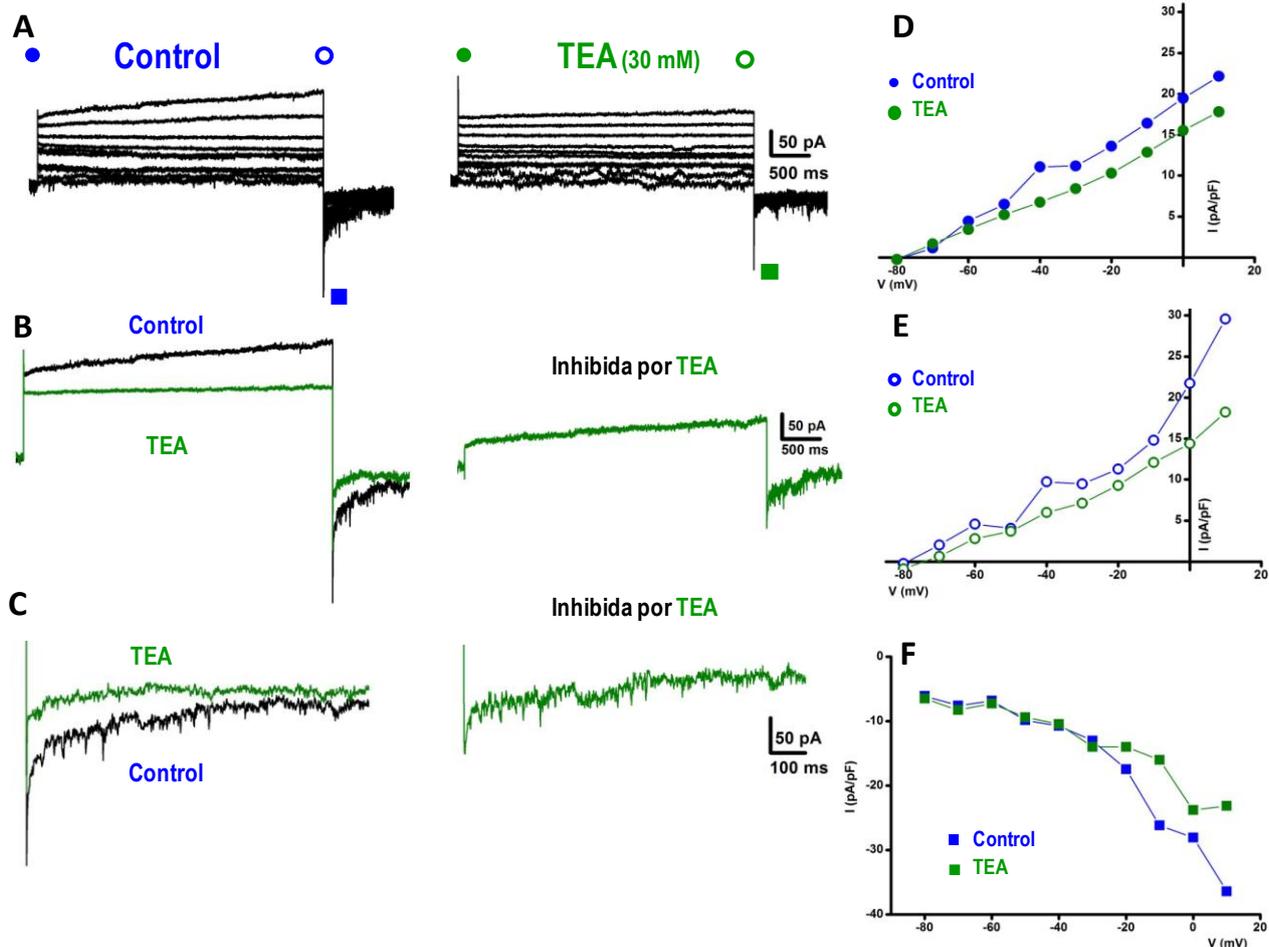


Figura 10. Efecto del TEA sobre las corrientes de K⁺ totales y de cola en las células HT29. (A) Corrientes generadas por el protocolo de voltaje como en la **figura 9** en células HT29 en condiciones control (**izquierda**) y en presencia de TEA (**derecha**). (B) En la izquierda, corrientes activadas por el pulso de 10 mV con (**verde**) y sin TEA (**azul**). A la derecha, la corriente inhibida por TEA. (C) Corriente de cola control y con TEA, activada por la repolarización a -100 mV después del pulso P1 a 10 mV (**izquierda**), y la corriente de cola que inhibe el TEA (**derecha**). (D-F) Relaciones I-V de los experimentos en A (Polígonos azules, controles; polígonos verdes, con TEA).

4.5. Corrientes herg en las células HT29: constante de tiempo de la desactivación.

Para estudiar la recuperación de la inactivación de los canales herg en las HT29 se aplicó un protocolo de dos pulsos (P1, P2) pero en este caso P1 fue de 40 mV y P2 consistió en una serie de pulsos de voltaje desde -120 mV a 40 mV. El potencial E_{K+} y de mantenimiento fueron de -80 mV. Las corrientes activadas con el pulso P1 fueron salientes y aumentando su amplitud al final del pulso (**Figura 11A**). Las corrientes generadas por P2 a voltajes más despolarizantes que 0 mV no

mostraron la forma de “gancho”, y su amplitud fue constante hasta el final del pulso. Para pulsos más hiperpolarizantes que 0 mV, se observaron corrientes entrantes de cola de activación rápida, cuyas amplitudes aumentaron con los voltajes más hiperpolarizantes, y decayeron al final del pulso de voltaje.

Con el fin de estudiar la velocidad de recuperación de la inactivación, provocada por el P1 (40 mV), se ajustó la activación de las corriente para P2= -120 mV a una exponencial simple de la forma: $I = e^{-\frac{V}{\tau}}$ (**Figura 11D**). El valor de t promedio, que corresponde al tiempo de recuperación de la inactivación (τ), fue 0.22 ± 0.03 ms ($n=2$).

Por otra parte, utilizamos la corriente de cola del pulso más hiperpolarizante (P2, -120 mV) para calcular el tiempo de decaimiento. Ésta se ajustó a una suma de dos exponenciales de la forma $I = e^{-\frac{V}{\tau_1}} + e^{-\frac{V}{\tau_2}}$ (**11C**). Los valores de las constantes obtenidos del ajuste, fueron: $\tau_1=34 \pm 16$ ms y $\tau_2=8 \pm 0,5$ ms ($n=2$).

El valor de la constante de tiempo de la recuperación de la inactivación de las corrientes de cola es similar a las reportadas para canales herg expresados heterológamente (Zhou et al., 1998; Spector et al., 1996). Por otro lado, en el decaimiento de la corriente de cola se encontraron dos constantes de tiempo, que podrían indicar que la desactivación de la corriente tiene dos componentes. Sin embargo, para corroborar estos datos sería necesario estudios adicionales.

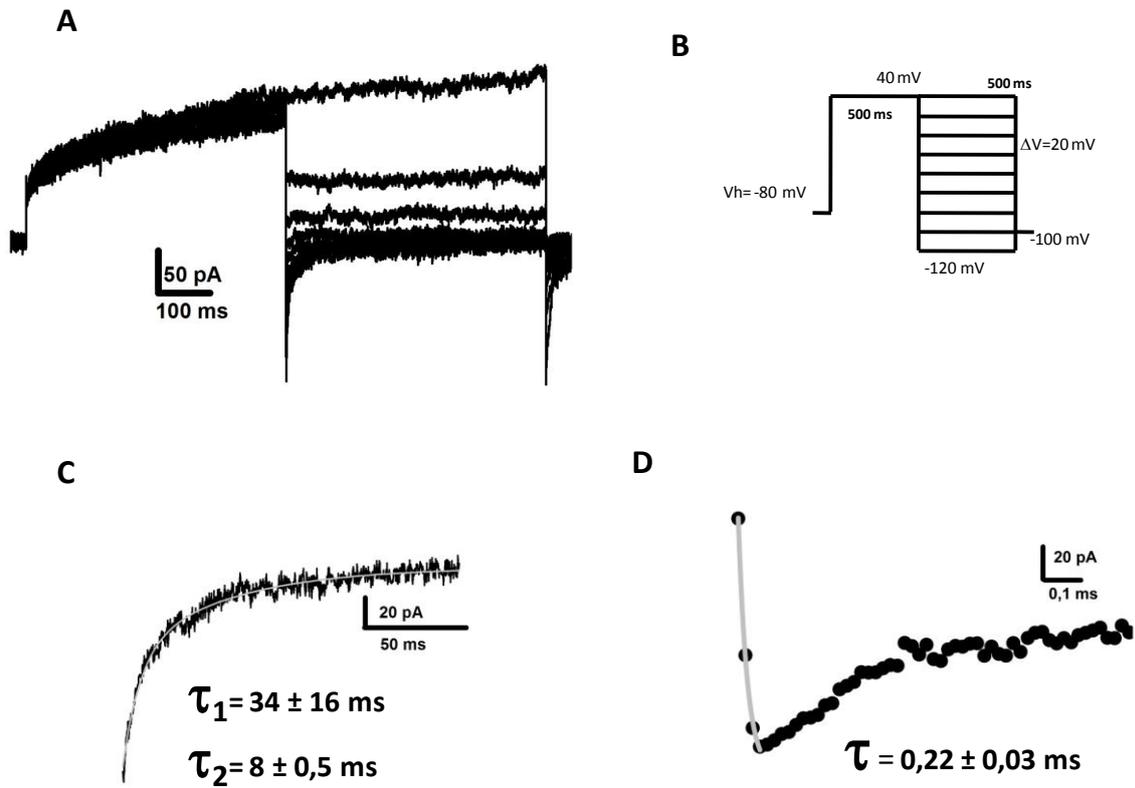


Figura 11. Velocidad de recuperación de la inactivación y de la desactivación de las corrientes hERG en células HT29. (A) Corrientes generadas por el protocolo de 2 pulsos de voltaje (B). Decaimiento (C) y recuperación de la inactivación (D) de la corriente de cola para el pulso más hiperpolarizante (-120 mV).

V. Discusión

En el presente estudio, mostramos que en las células de colon normales (NCM460) y en las tumorales (HT29) las principales corrientes activadas por voltaje son corrientes de K^+ . Sin embargo, el hallazgo más interesante fue mostrar que, en contraste con las células normales de colon, las células tumorales, al parecer, expresan corrientes de K^+ activadas por voltaje que podrían ser mediadas por canales herg.

La expresión de corrientes de K^+ en las células NCM460 (dato no mostrado) y en las HT29 fue confirmada farmacológicamente con el TEA. Este inhibidor de corrientes de K^+ de amplio espectro (Hille, 1991) disminuyó significativamente la amplitud de las corrientes totales en todas las células examinadas. Además, en las células HT29 el TEA también afectó a las corrientes de cola, inhibiendo aproximadamente el 40% de la amplitud máxima de estas corrientes. Este resultado coincide con un estudio previo, en el que el TEA (a la misma concentración que la que se empleó aquí) inhibió aproximadamente el 36% de las corrientes mediadas por canales herg expresados en células CHO-K1 (Choi et al., 2011).

La expresión de los canales herg está restringida en las células normales. Sin embargo, en células cancerígenas estos canales aparecen o aumentan su expresión (Camacho, 2006; Huber, 2013; Vandenberg et al., 2012). En este sentido aquí mostramos que las células HT29, que corresponden a células de colon cancerígenas, muestran corrientes de cola, muy probablemente mediadas por canales herg; en cambio, las células NCM460, que son células de mucosa de colon humana normal, carecen de estas corrientes. Estos resultados son consistentes con estudios anteriores que mostraron que las células HT29, así como otras líneas celulares de cáncer de colon (Chen et al., 2005; Gong et al., 2010; Lastraioli et al., 2004), expresan tanto el ARN mensajero como la proteína herg (Dolderer et al., 2010). Asimismo, cabe resaltar que en los estudios realizados con muestras de tejido de pacientes con cáncer de colon, también hay una expresión alta de la proteína que constituye el canal herg en las células cancerosas pero no en las normales (Dolderer et al., 2010). Además, numerosas evidencias experimentales y obtenidas de muestras de pacientes han mostrado la estrecha relación que existe entre los canales herg y numerosos tipos de cáncer (Bianchi et al., 1998; Gong et al., 2010; Chen et al., 2005; Jehle et al., 2011).

En las células HT29, la expresión de la corriente de cola en forma de gancho durante la repolarización de la membrana, indica la presencia de canales herg, ya que esta característica distingue a estos canales de entre otros K_v (Piper et al., 2003; Vandenberg et al., 2012; Glassmeier et al., 2012). Para corroborar lo anterior, estudiamos algunas de las propiedades biofísicas de las corrientes de cola de las células HT29, y así compararlas con las corrientes mediadas por canales herg. El voltaje al cual se activó la mitad de la corriente de cola en las células HT29 fue de -28 mV, un valor similar al reportado para la misma corriente en células del nodo sinoatrial (-25 mV; Shibashaki, 1987) y células HEK-293 y CHO transfectadas con canales herg -30,6 mV y -18,9 mV (Su et al., 2009; Youm et al., 2004), respectivamente. Otra característica estimada fue la constante de tiempo de recuperación de la inactivación de las corrientes de que fue de 0.22 ± 0.03 ms ($n=3$) muy cercana a las encontradas en la bibliografía aproximadamente entre 0,2 ms (Zhou et al., 1998) y 1 ms (Spector et al., 1996; Zhang et al., 2003). Se sabe que esta constante depende del voltaje, como en las corrientes herg de células HEK-293 (Su et al., 2009; Zhang et al., 2003; Zhou et al., 1998) y de ovocitos transfectados con el canal (Spector et al., 1996; Wang et al., 1996; Sanguinetti et al., 1995). Cabe indicar que se necesita extender este estudio para verificar, por ejemplo que los

canales herg expresados endógenamente por las células HT29 sean diferentes a los expresados heterológicamente. De hecho, la subfamilia de canales herg consta de tres miembros (erg1-3) que pueden formar homómeros o heterómeros (Bauer y Schwarz, 2001; Vandenberg et al., 2012). Otra posibilidad por explorar es que exista alguna proteína asociada al canal herg endógeno de las células HT29 que modifique sus propiedades y funciones (Zhou et al., 1998). Asimismo, se debe determinar si cuando se mide la recuperación de la inactivación exista solapamiento entre ésta y la desactivación (Zhang et al., 2003).

Por otro lado, hemos estimado las constantes de tiempo para la desactivación del pulso más hiperpolarizante (-120 mV) resultando en dos valores $\tau_1 = 34 \pm 16$ ms (componente lenta) y $\tau_2 = 8,0 \pm 0,5$ ms (componente rápida) para concentración normal de K^+ extracelular. Estos datos son similares a los obtenidos en células HEK-293 transfectadas con el canal herg: 4 y 30 ms componentes rápida y lenta, respectivamente (Su et al., 2009). Así, para el mismo pulso de -120 mV, la constante de tiempo rápida es aproximadamente 5 ms y la lenta cerca de 30 ms (Su et al., 2009). Además, aunque nosotros no lo determinamos, se sabe que la desactivación depende del voltaje (Wang et al., 1997; Sanguinetti et al., 1995; Zhang et al., 2003). Asimismo, para la concentración de 40mM de K^+ extracelular, también se midieron las constantes de tiempo para la desactivación del pulso más hiperpolarizante (-120 mV) dando lugar, nuevamente, a dos valores $\tau_1 = 93 \pm 18$ ms (componente lenta) y $\tau_2 = 9 \pm 4$ ms (componente rápida). Estos valores no fueron, estadísticamente, distintos de los obtenidos con K^+ extracelular normal, pero la tendencia mostrada es que el K^+ extracelular modifica las constantes de tiempo (Sturm et al., 2005; Vandenberg et al., 2012).

Las corrientes de K^+ obtenidas en las células HT29, podrían incluir también corrientes mediadas por canales eag. La proteína y el ARN mensajero de éste último se expresan en las células HT29. También se ha mostrado que en estudios realizados con muestras de tejido de pacientes con cáncer de colon, también hay una expresión alta de la proteína eag en las células cancerosas pero no en las normales (Ding et al., 2007). Ahora bien, en nuestros resultados para K^+ extracelular normal, al inicio de los pulsos despolarizantes hemos encontrado una corriente transitoria que se activa y luego se inactiva muy rápidamente dando lugar a un pico. Esto es característico de los canales herg y no de los eag, puesto que los primeros se activan y desactivan lentamente y se inactivan mucho más rápidamente; en cambio los eag, se activan y desactivan pero prácticamente no se inactivan. Para poder discernir la contribución de cada tipo de canal a la corriente total de K^+ , habría que realizar experimentos farmacológicos, con un inhibidor específico como E-4031 que bloquea específicamente a los herg (Glassmeier et al., 2012; Zhou et al., 1998)

La gran importancia de estudiar los canales herg en las células HT29 (modelo de cáncer de colon) radica en que una vez confirmada su expresión en estas células, podría ahondarse en la relevancia de la función de estos canales en las principales características de las células tumorales, la proliferación descontrolada y la resistencia a la muerte celular. En esta línea, se ha mostrado que el bloqueo con fármacos de los canales herg, reduce significativamente la proliferación en diversas líneas celulares de colon incluyendo las células H630, HCT8 (Lastraioli et al., 2004; Vandenberg et al., 2012), HT116 y HT29 (Gong et al., 2010). Se ha propuesto que el mecanismo por el cual los canales herg contribuyen a la proliferación de las células tumorales es debido a los cambios del voltaje de membrana (Spitzner et al. 2007). Sin embargo, existen también evidencias de que la

función como canal conductor de potasio no es necesaria, ya que mientras el bloqueo con inhibidores específicos no afecta a la proliferación de células de cáncer de pulmón, la inhibición de la expresión de canales hERG mediante siRNA disminuye esta función celular (Glassmeier et al., 2012). Así mismo, la función independiente de su actividad como canal iónico, se cree que se debe a su asociación con otras proteínas intracelulares como las integrinas que a su vez, modulan la proliferación celular (Vandenberg et al., 2012; Hofmann et al., 2001).

Por otro lado, es conocido que los inhibidores de los canales hERG presentan ciertos riesgos cardiotoxicos y proarrítmicos cuando se aplican en pacientes oncológicos (Jehle et al., 2011). Tratamientos sistémicos del cáncer con estos antagonistas de los hERG afectan a los cardiomiocitos induciendo su apoptosis y el consiguiente fallo cardíaco; además algunos antagonistas pueden inducir el síndrome del LQT y taquicardias ventriculares (Sanguinetti, 2006; Jehle, 2011). Estos efectos sobre los cardiomiocitos tendrían que tenerse en cuenta a la hora de emplear los distintos fármacos contra el cáncer. Además, no se puede descartar la participación de otros canales de la familia de los hERG en las células tumorales como los canales *Eag1*. Estos canales solo se expresan principalmente en cerebro en tejido normal (Rodríguez-Rasgado et al., 2012). Sin embargo su expresión se ve incrementada de forma exacerbada en células cancerígenas y, de forma particular en las células HT29 (Ding et al., 2007).

Los canales hERG podrían utilizarse como marcadores tumorales. En el caso del cáncer de colon, la expresión del ARN mensajero de esta proteína se ha correlacionado con el grado de malignidad del tumor. Adicionalmente, se ha descrito que cuanto mayor sea la expresión de canales hERG, el pronóstico y resistencia a los tratamientos farmacológicos empeora. Finalmente, el uso de los canales hERG como marcadores tumorales ha mostrado ser altamente específico frente a otros marcadores como el CEA (Antígeno carcinoembrionario; es un marcador tumoral en pacientes con cáncer colorrectal). La sensibilidad para los canales hERG es el 100% frente al 94% del CEA (Jehle et al., 2011). Finalmente, es necesario realizar estudios adicionales para determinar el papel fisiopatológico de los canales hERG en el cáncer de colon y otros tipos de cánceres.

VI. Conclusiones

- 1) En las células normales (NCM460) y las tumorales (HT29), las principales corrientes activadas por voltaje son de K^+ .
- 2) Las células HT29 presentan corriente de cola muy probablemente mediada por canales herg en contraposición con las células NCM460.
- 3) Las corrientes de cola son inhibidas por TEA.
- 4) El voltaje al cual se activa la mitad de la corriente de cola de las células HT29 fue de -28 mV.
- 5) La constante temporal de recuperación de la inactivación fue $\tau=0,29$ ms.
- 6) Las constantes de desactivación (a -120 mV), lenta y rápida, fueron $\tau_1=34$ ms y $\tau_2=8$ ms, respectivamente.
- 7) El hecho de que los canales herg se expresan en las células cancerígenas (HT29) y no en las normales (NCM460), pueden otorgarles a las primeras ciertas capacidades que les darían ventaja sobre las normales, a la hora de proliferar, sobrevivir o invadir otros tejidos.

VII. Bibliografía

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walker P. "Biología molecular de la célula", quinta ed. Omega, Barcelona, 2008.

Asher V, Khan R, Warren A, Shaw R, Schalkwyk GV, Bali A, Sowter HM (2010). The Eagpotassium channel as a new prognostic marker in ovarian cancer. *Diagn Pathol.*5:78.

Bauer CK, Schwarz JR (2001). Physiology of EAG K⁺ channels. *J Membr Biol.* 182:1-15.

Becchetti A. (2011) Ion channels and transporters in cancer. 1. Ion channels and cell proliferation in cancer. *Am J Physiol Cell Physiol.* 301:C255-265.

Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL (2004) Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature.* 432:332-337.

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

Chen SZ, Jiang M, Zhen YS (2005). [Correlation of HERG K⁺ channel protein expression to chemosensitivity of tumor cells to doxorubicin and its modulation by erythromycin]. *Ai Zheng.* 24:924-929.

Cheng N, Chytil A, Shyr Y, Joly A, Moses HL(2008) Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol Cancer.* 6:1521-1533

Choi KL, Aldrich RW, Yellen G (1991). Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:5092-5095.

Choi KH, Song C, Shin D, Park S (2011). hERG channel blockade by externally applied quaternary ammonium derivatives. *Biochim Biophys Acta.*1808:1560-1566.

Cockerill SL, Tobin AB, Torrecilla I, Willars GB, Standen NB, Mitcheson JS (2007). Modulation of hERG potassium currents in HEK-293 cells by protein kinase C. Evidence for direct phosphorylation of pore forming subunits. *J Physiol.* 581:479-493.

Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B. (1999) Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann N Y Acad Sci.* 30;868:233-285.

Claycomb WC, Lanson NA Jr, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo NJ Jr (1998). HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:2979-2984.

Crociani O, Cherubini A, Piccini E, Polvani S, Costa L, Fontana L, Hofmann G, Rosati B, Wanke E, Olivotto M, Arcangeli A (2000). *erg* gene(s) expression during development of the nervous and muscular system of quail embryos. *Mech Dev.* 95:239-243.

Cuddapah VA, Sontheimer H. (2011) Ion channels and transporters [corrected] in cancer. 2. Ion channels and the control of cancer cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol.* 301:C541-549.

Cui J, Melman Y, Palma E, Fishman GI, McDonald TV (2000). Cyclic AMP regulates the HERG K⁽⁺⁾ channel by dual pathways. *Curr Biol.* 10:671-674.

Ding XW, Yan JJ, An P, Lü P, Luo HS (2007). Aberrant expression of ether à go-go potassium channel in colorectal cancer patients and cell lines. *World J Gastroenterol.* 13:1257-1261.

Dolderer JH, Schuldes H, Bockhorn H, Altmannsberger M, Lambers C, von Zabern D, Jonas D, Schwegler H, Linke R, Schröder UH (2010). HERG1 gene expression as a specific tumor marker in colorectal tissues. *Eur J Surg Oncol.* 36:72-77.

Dun W, Jiang M, Tseng GN (1999). Allosteric effects of mutations in the extracellular S5-P loop on the gating and ion permeation properties of the hERG potassium channel. *Pflugers Arch.* 439:141-149.

Enyedi P, Czirják G. (2010) Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev.* 90:559-605.

Fontana L, D'Amico M, Crociani O, Biagiotti T, Solazzo M, Rosati B, Arcangeli A, Wanke E, Olivetto M (2001). Long-term modulation of HERG channel gating in hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun.* 286:857-862.

Glassmeier G, Hempel K, Wulfsen I, Bauer CK, Schumacher U, Schwarz JR (2012). Inhibition of HERG1 K⁺ channel protein expression decreases cell proliferation of human small cell lung cancer cells. *Pflugers Arch.* 463:365-376.

Gong JH, Liu XJ, Shang BY, Chen SZ, Zhen YS (2010). HERG K⁺ channel related chemosensitivity to sparfloxacin in colon cancer cells. *Oncol Rep.* 23:1747-1756.

Grunnet M, Diness TG, Hansen RS, Olesen SP (2008). Biophysical characterization of the short QT mutation hERG-N588K reveals a mixed gain-and loss-of-function. *Cell Physiol Biochem.* 22:611-624.

Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674.

Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. (2010) Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev.* 90:291-366.

Hille B, *Ion channels of Excitable Membranes*; second ed. Sinauer, 1992.

Huber SM (2013). Oncochannels. *Cell Calcium.* 53:241-255.

Isbrandt D, Friederich P, Solth A, Haverkamp W, Ebneith A, Borggreffe M, Funke H, Sauter K, Breithardt G, Pongs O, Schulze-Bahr E (2002). Identification and functional characterization of a novel KCNE2 (MiRP1) mutation that alters HERG channel kinetics. *J Mol Med (Berl).* 80:524-532.

Jehle J, Schweizer PA, Katus HA, Thomas D (2011). Novel roles for hERG K(+) channels in cell proliferation and apoptosis. *Cell Death Dis.* 2:e193.

Korn SJ, Trapani JG. (2005) Potassium channels. *IEEE Trans Nanobioscience.* 4:21-33.

Lastraioli E, Guasti L, Crociani O, Polvani S, Hofmann G, Witchel H, Bencini L, Calistri M, Messerini L, Scatizzi M, Moretti R, Wanke E, Olivetto M, Mugnai G, Arcangeli A (2004). hERG1 gene and HERG1 protein are overexpressed in colorectal cancers and regulate cell invasion of tumor cells. *Cancer Res.* 64:606-611.

Lehninger, A. "Bioquímica, las bases moleculares de la estructura y función celular"; segunda ed. Omega, Barcelona, 1989.

López-López JR, Pérez-García MT. (2007) Oxygen sensitive Kv channels in the carotidbody. *Respir Physiol Neurobiol.* 157:65-74.

Miller C. (2000) An overview of the potassium channel family. *Genome Biol.* 1(4):REVIEWS0004.

Onuigbo WI (1975) A definition problem in cancer metastasis. *Neoplasma* 22:547-550.

Piper DR, Varghese A, Sanguinetti MC, Tristani-Firouzi M (2003). Gating currents associated with intramembrane charge displacement in HERG potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.*100:10534-10539.

Rodríguez-Rasgado JA, Acuña-Macías I, Camacho J (2012). Eag1 channels as potential cancer biomarkers. *Sensors (Basel).* 12:5986-5995.

Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT (1995). A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell.* 81:299-307.

Sanguinetti MC, Tristani-Firouzi M (2006). hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature.* 440:463-469.

Schönherr R, Heinemann SH (1996). Molecular determinants for activation and inactivation of HERG, a human inward rectifier potassium channel. *J Physiol.* 493:635-642.

Shibasaki T (1987). Conductance and kinetics of delayed rectifier potassium channels in nodal cells of the rabbit heart. *J Physiol.*387:227-250.

Smith PL, Yellen G (2002). Fast and slow voltage sensor movements in HERG potassium channels. *J Gen Physiol.* 119:275-93.

Spector PS, Curran ME, Zou A, Keating MT, Sanguinetti MC (1996). Fast inactivation causes rectification of the IKr channel. *J Gen Physiol.* 107:611-619.

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

Sturm P, Wimmers S, Schwarz JR, Bauer CK (2005). Extracellular potassium effects are conserved within the rat erg K⁺ channel family. *J Physiol.* 564:329-345.

Su Z, Limberis J, Souers A, Kym P, Mikhail A, Houseman K, Diaz G, Liu X,

Martin RL, Cox BF, Gintant GA (2009). Electrophysiologic characterization of a novel hERG channel activator. *Biochem Pharmacol.* 77:1383-1390.

Taketo MM (2012) Roles of stromal microenvironment in colon cancer progression. *J.Biochem.* 151:477-481.

Van Slyke AC, Rezazadeh S, Snopkowski M, Shi P, Allard CR, Claydon TW (2010). Mutations within the S4-S5 linker alter voltage sensor constraints in hERG K⁺ channels. *Biophys J.* 99:2841-2852.

Vandenberg JI, Perry MD, Perrin MJ, Mann SA, Ke Y, Hill AP (2012). hERG K(+) channels: structure, function, and clinical significance. *Physiol Rev.* 92:1393-1478.

- Warmke JW, Ganetzky B (1994). A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:3438-3442.
- Wang L, Duff HJ (1996). Identification and characteristics of delayed rectifier K⁺ current in fetal mouse ventricular myocytes. *Am J Physiol*. 270:H2088-H2093.
- Wang S, Liu S, Morales MJ, Strauss HC, Rasmusson RL (1997). A quantitative analysis of the activation and inactivation kinetics of HERG expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol*. 502:45-60.
- Wertz IE, Dixit VM (2010) Regulation of death receptor signaling by the ubiquitin system. *Cell Death Differ*. 17:14-24.
- Youm JB, Earm YE, Ho WK (2004). Modulation of HERG channel inactivation by external cations. *Eur Biophys J*. 33:360-369.
- Zhang Y, Wang H, Wang J, Han H, Nattel S, Wang Z (2003). Normal function of HERG K⁺ channels expressed in HEK293 cells requires basal protein kinase B activity. *FEBS*. 534:125-132.
- Zhang S, Kehl SJ, Fedida D (2003). Modulation of human ether-à-go-go-related K⁺ (HERG) channel inactivation by Cs⁺ and K⁺. *J Physiol*. 548:691-702.
- Zhang M, Liu J, Jiang M, Wu DM, Sonawane K, Guy HR, Tseng GN (2005). Interactions between charged residues in the transmembrane segments of the voltage-sensing domain in the hERG channel. *J Membr Biol*. 207:169-181.
- Zhou Z, Gong Q, Ye B, Fan Z, Makielski JC, Robertson GA, January CT (1998). Properties of HERG channels stably expressed in HEK 293 cells studied at physiological temperature. *Biophys J*. 74:230-241.