



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Laboratorio de Procesos Biotecnológicos

Trabajo Final

**Estudio de los efectos de las hormonas
tiroideas sobre la expresión y actividad del
canal Hv1 en linfomas de células T**

Lucero Aldana Alvarado

Directora: Dra. Florencia Cayrol

Co-directora: Dra. Clara Ventura

2024

ÍNDICE

1. Introducción.....	3
1.1 Linfomas.....	3
1.1.1 Clasificación y características generales.....	3
1.1.2 Linfoma no-Hodgkin	3
1.1.3 Linfomas de células T.....	5
1.2 Hormonas Tiroideas.....	8
1.2.1 Eje hipotalámico-hipofisario-tiroideo.....	8
1.2.2 Mecanismos de acción de las hormonas tiroideas.....	10
1.2.3 Efectos biológicos de las hormonas tiroideas	12
1.2.4 Hormonas tiroideas como factor de proliferación de los linfomas T	12
1.3 Canal de protones Hv1.....	13
1.3.1 Estructura del canal Hv1.....	13
1.3.2 Propiedades de la corriente mediada por el canal Hv1.....	14
1.3.3 Funciones fisiológicas descritas para el canal Hv1	15
1.3.4 El canal Hv1 en células tumorales	16
1.3.5 Posible relación entre los niveles de HTs y el canal Hv1	17
2. Hipótesis y Objetivos.....	18
3. Materiales y Métodos	19
3.1 Cultivo de las líneas celulares HuT78 y Karpas299	19
3.2 Evaluación de los niveles transcripcionales del gen <i>HVCN1</i>	19
3.2.1 Extracción y cuantificación del ARN	19
3.2.2 Retrotranscripción	20
3.2.3 qPCR	20
3.3 Evaluación de los niveles proteicos del canal Hv1.....	21
3.3.1 Protocolo de marcación	21
3.3.2 Análisis de los resultados	22
3.4 Evaluación de la actividad del canal Hv1	23
3.4.1 Introducción a la técnica de Patch-Clamp	23
3.4.2 Protocolos de medida	25
3.4.3 Análisis de los registros	27
3.5 Análisis estadístico.....	28
3.6 Análisis bioinformático	28
4. Resultados.....	31
4.1 Expresión y actividad del canal Hv1 a nivel basal	31
4.1.1 Evaluación de la actividad del canal Hv1 en líneas celulares derivadas de linfomas T	31
4.1.2 Evaluación de los niveles transcripcionales del gen <i>HVCN1</i>	34

4.1.3 Evaluación de los niveles proteicos del canal Hv1	35
4.2 Efecto de concentraciones fisiológicas de HTs sobre la expresión y actividad del canal Hv1 ..	36
4.2.1 Análisis bioinformático	36
4.2.2 Evaluación de los niveles transcripcionales del gen <i>HVCN1</i> en células tratadas con concentraciones fisiológicas de HTs	36
4.2.3 Evaluación de los niveles proteicos del canal Hv1 en células tratadas con concentraciones fisiológicas de HTs	38
4.2.4 Evaluación funcional del canal Hv1 en células tratadas con concentraciones fisiológicas de HTs	39
5. Discusión	42
5.1 Diferencias en la expresión y actividad del canal Hv1 entre ambas líneas celulares	42
5.2 Regulación del canal Hv1 por parte de las HTs	43
5.3 Problemas de reproducibilidad observados	43
5.4 Perspectivas a futuro de la línea de investigación.....	44
6. Conclusiones	45
7. Anexos.....	46
8. Bibliografía	48

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Linfomas

1.1.1 Clasificación y características generales

Los linfomas son un grupo de neoplasias hematológicas, que se desarrollan por la expansión clonal de alguna línea linfoide (linfocitos B, T o NK). Se dividen en dos tipos principales, linfoma de Hodgkin (LH) y linfoma no-Hodgkin (LNH), de acuerdo a si hay presencia o no de un tipo particular de células denominadas de Hodgkin y Reed-Sternberg. Estas células son generalmente derivadas de linfocitos B, presentan un tamaño anormalmente grande y suelen ser multinucleadas.

Los LNH se presentan con mayor frecuencia que los LH y presentan una mayor heterogeneidad, existiendo más de 30 subtipos diferentes. Los LNH se clasifican según el linaje celular en linfomas de células B (LCBs, representan alrededor del 85% de los LNH) o linfomas de células T y NK (LCTs, representan aproximadamente el 15% de los casos de LNH)¹. En este trabajo, nos centraremos en este último.

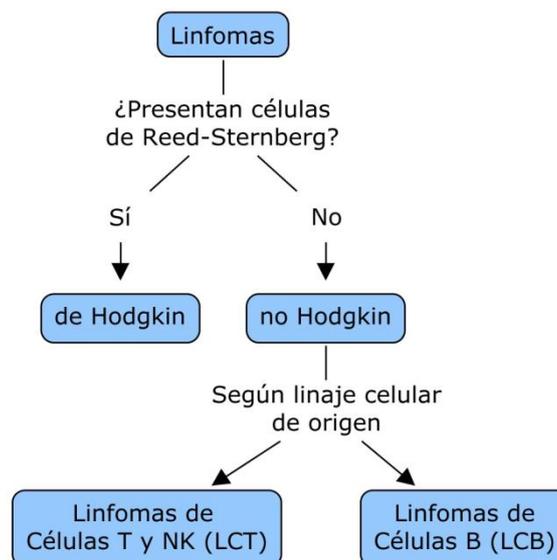
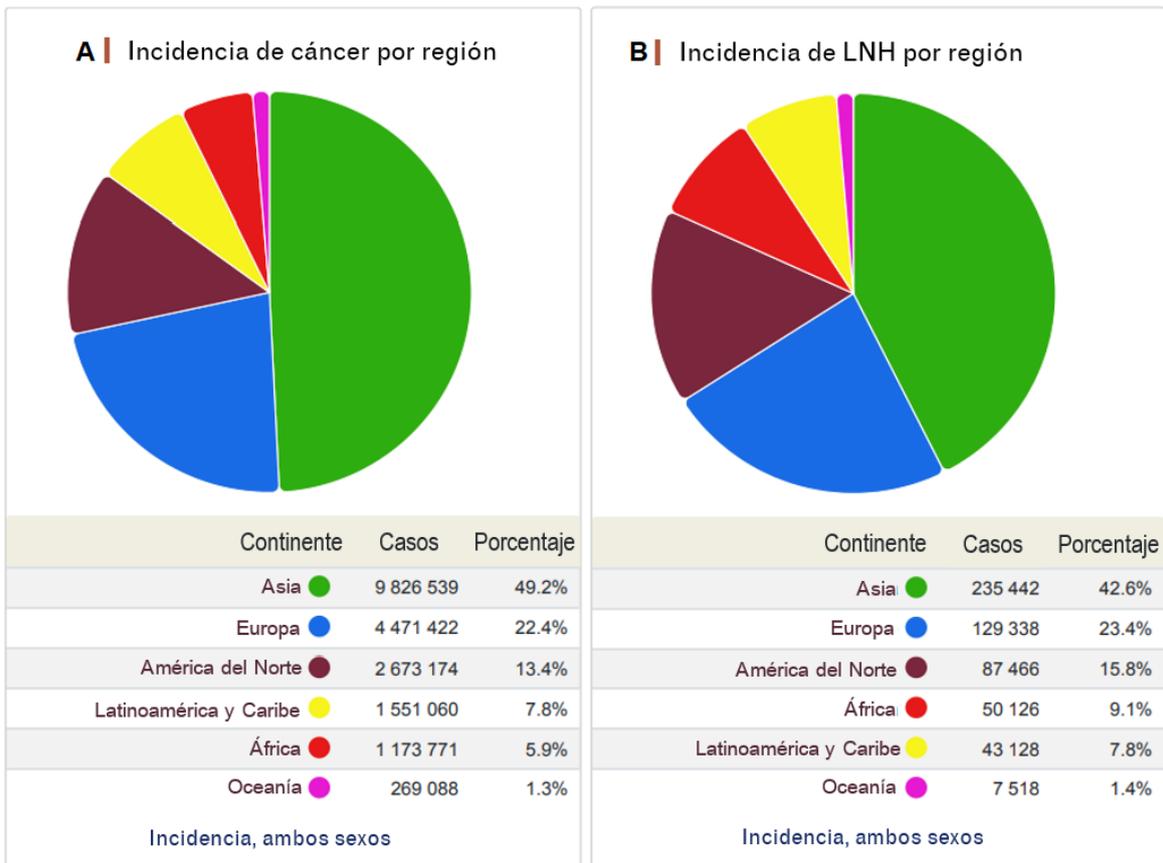


Figura 1: Clasificación de los linfomas

1.1.2 Linfoma no-Hodgkin

Estadísticas:

Según las estimaciones realizadas por el Observatorio Global del Cáncer (GLOBOCAN) de la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC-OMS) en el año 2022, el LNH es el onceavo tipo de cáncer con mayor incidencia alrededor del mundo, y también el onceavo con mayor mortalidad². En la **Figura 2**, puede observarse que el patrón de distribución entre continentes de las incidencias de LNH es similar a la distribución geográfica de la totalidad de las incidencias de cáncer.



Figuras 2A y 2B: Distribución de incidencia en los diferentes continentes de todos los cánceres (A) y de LNH (B)
Fuente: GLOBOCAN 2022, con modificaciones

La misma fuente indica que en Argentina el LNH se ubica como el décimo tipo de cáncer con mayor cantidad de nuevos casos, representando el 2,9% del total de nuevos casos de cáncer en nuestro país. Al considerar los sexos por separado, en varones los casos de LNH representan el 3,1% de los casos incidentes mientras que en mujeres representan el 2,7% de los casos. Las muertes debido a LNH representan el **2,3% del total de las muertes por cáncer en Argentina**, observándose también una diferencia entre varones y mujeres (2,5% y 2,0% respectivamente). De este modo, el LNH se encuentra en el decimotercer puesto entre los tipos de cáncer con mayor cantidad de muertes en Argentina.

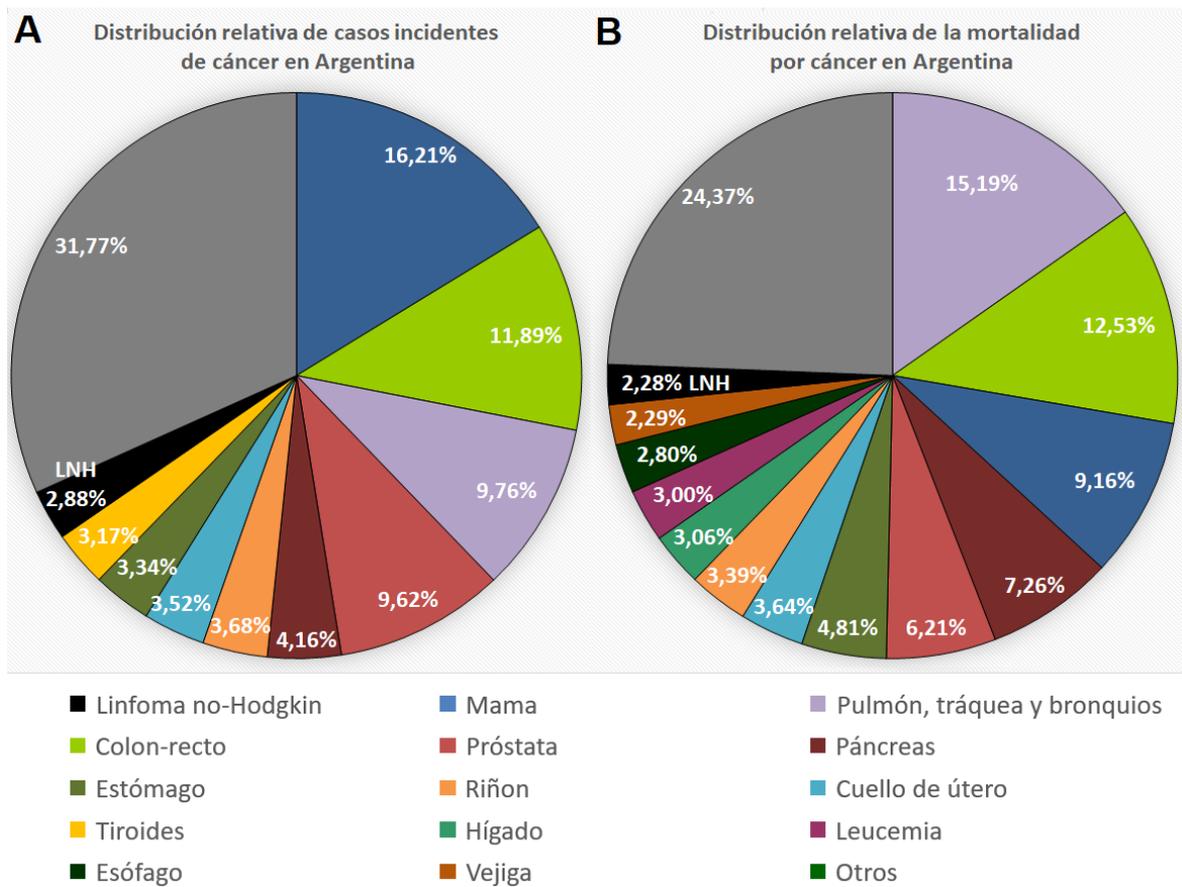


Figura 3: Tipos de cáncer con mayor incidencia (A) y mortalidad (B) en nuestro país. Fuente: elaboración propia a partir de datos disponibles en GLOBOCAN 2022

Factores de riesgo:

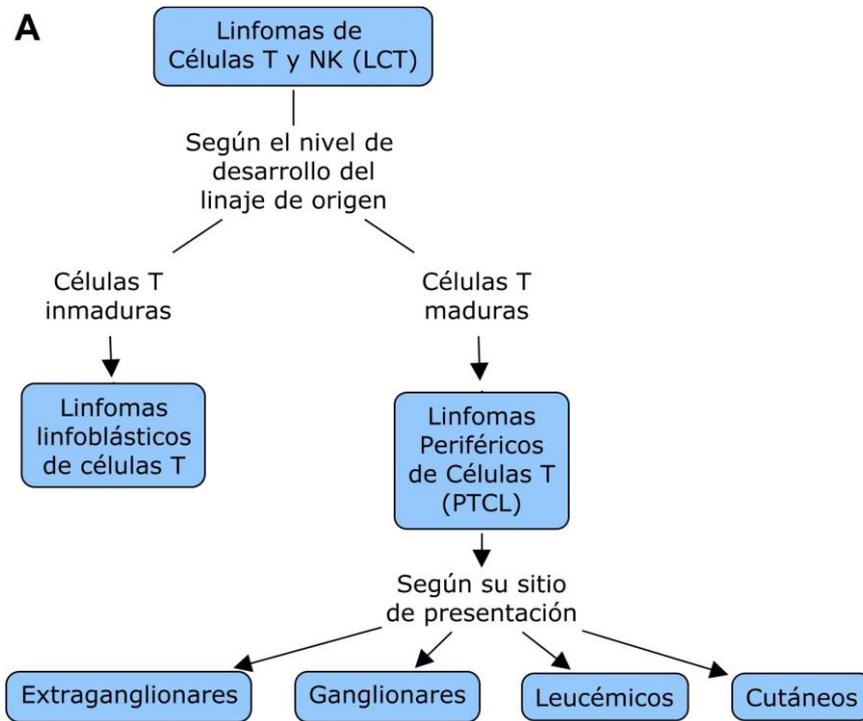
Se han encontrado numerosos factores que aumentan el riesgo de LNH: factores genéticos (antecedentes familiares de neoplasias hematológicas), ambientales y del estilo de vida (consumo de alcohol, tabaquismo, índice de masa corporal elevado), enfermedades previas (enfermedades autoinmunes, eczema), infecciones con determinados virus o bacterias (virus de la hepatitis C, virus de Epstein-Barr, virus de la inmunodeficiencia humana, virus linfotrópico de células T humanas tipo 1, infección con *Helicobacter pylori*), entre otros³⁻⁶

1.1.3 Linfomas de células T

Los linfomas de células T (LCTs) son un grupo heterogéneo tanto a nivel molecular como clínico de trastornos linfoproliferativos, que pueden clasificarse en dos grandes grupos según su origen: linfomas linfoblásticos de células T, que surgen a partir de células T inmaduras o precursoras y representan una minoría de los casos; y linfomas de células T periféricos (PTCL, *del inglés Peripheral T-cell lymphoma*), que surgen a partir de células T maduras y representan la mayoría de los LCTs⁷. Los PTCLs son relativamente más frecuentes en Asia, América Central y Sudamérica que en otras regiones, y se suelen subdividir de acuerdo a su forma de presentación en cuatro categorías⁸:

- **Ganglionares.** Se originan en los ganglios linfáticos, es el tipo más frecuente. Las variedades más comunes dentro del tipo ganglionar son el linfoma anaplásico de células grandes (ALCL), el LCT angioinmunoblástico, y el PTCL no especificado de otro modo (PTCL-NOS).

- **Cutáneos.** Se originan en la piel, en principio sin manifestaciones extracutáneas aunque estas pueden aparecer en estadios avanzados de la enfermedad. Los subtipos más comunes de LCT cutáneo (CTCL) son la Micosis Fungoide (MF) y el Síndrome de Sézary (SS).
- **Extraganglionares.** Se originan en sitios distintos a los ganglios, excluyendo a los LCT cutáneos. Un ejemplo dentro de este grupo son los linfomas de células T intestinales.
- **Leucémicos o diseminados.** Se originan en sangre o médula ósea, pueden progresar a otros tejidos. Un ejemplo es la leucemia/linfoma de células T del adulto (ATL).



B

Linfomas periféricos de células T			
Ganglionares	Extraganglionares	Cutáneos	Leucémicos
PTCL no especificado de otro modo (PTCL-NOS)	Linfoma hepatoesplénico de células T	Micosis fungoide (MS)	Leucemia prolinfocítica T
LCT angioinmunoblástico (AITL)	Linfoma extranodal nasal de células NK/T	<u>Síndrome de Sézary (SS)</u>	Leucemia de linfocitos T grandes granulares (LGL)
<u>Linfoma anaplásico de células grandes (ALCL) sistémico. Subtipos ALK+ y ALK-</u>	Linfoma anaplásico de células grandes (ALCL) asociado a implantes mamarios	Linfoma anaplásico de células grandes (ALCL) cutáneo	Leucemia/linfoma de células T del adulto HTVL1
	LCT intestinal asociado a enteropatía (AETL)	Síndrome linfoproliferativo CD30+ cutáneo primario	
	LCT intestinal epiteliotrópico monomórfico (MEITL)		

Figura 4: A) Criterios de clasificación de los LCTs. **B)** Principales subtipos de PTCLs; se encuentran subrayados los correspondientes a líneas celulares utilizadas durante este trabajo.

Debido a esta gran variedad, a la falta de tratamientos específicos y al curso clínico agresivo de la enfermedad, la gran mayoría de los pacientes con PTCL tienen un pronóstico desfavorable, salvo en algunos subtipos puntuales que cuentan con terapias efectivas. Para la mayoría de los

subtipos de PTCL se utilizan tratamientos derivados de los que se emplean para los linfomas de células B, a pesar de que ambas patologías son significativamente diferentes. Este hecho se postula como una causa importante de que los LCTs tengan un pronóstico peor que sus homólogos de células B⁹. Esto, sumado al hecho de que el diagnóstico suele ser tardío, contribuye a que el pronóstico de esta patología sea poco alentador¹⁰. Por estas razones, el estudio de los PTCLs reviste especial importancia, aunque su incidencia sea baja en comparación con otras patologías oncológicas. El subtipo ALK+ de ALCL es una excepción notable, ya que se han desarrollado terapias efectivas para este y está asociado con un buen pronóstico¹¹.

En las **Figuras 4A y 4B** se resumen los criterios de clasificación de los LCTs y se mencionan los subtipos más notables dentro del grupo de los PTCLs. Ya que en este trabajo se utilizaron líneas celulares correspondientes a los subtipos ALCL ALK+ (Karpas299) y SS (HuT78), los mismos se describirán en más detalle en las siguientes secciones.

Linfoma ganglionar ALCL:

El linfoma anaplásico de células grandes (ALCL) es un tipo de PTCL relativamente frecuente, representando aproximadamente el 15% de los LCTs. Las células tumorales de ALCL se caracterizan por ser de gran tamaño, presentar anomalías como núcleos de forma aberrante y mitosis atípicas, y poseer la proteína CD30 en superficie celular.

Existen varios subtipos de ALCL, siendo los más frecuentes el ALK positivo (ALK+) y el ALK negativo (ALK-). Se caracterizan, respectivamente, por la presencia o ausencia de una forma anormal de la quinasa del linfoma anaplásico (ALK), una proteína que normalmente participa en procesos de desarrollo y diferenciación celular, particularmente del sistema nervioso. En los ALCL ALK+, se produce una translocación cromosomal que provoca la fusión del gen *ALK* con genes que codifican para otras proteínas, dando como resultado una oncoproteína de fusión constitutivamente activada.

El subtipo ALK+ es más frecuente que el ALK-. Suele afectar a niños y jóvenes adultos, su incidencia es 3 veces mayor en hombres que en mujeres. Suele responder bien al tratamiento con quimioterapia CHOP (denominada así por las iniciales de los cuatro fármacos utilizados: Ciclofosfamida, Hidroxidaunorrubicina/doxorubicina, Oncovin/vincristina y Prednisona), y es potencialmente curable, presentando además una menor tasa de recurrencia que el ALK-.

Linfomas cutáneos de células T:

Los linfomas cutáneos de células T (CTCL) son aquellos linfomas que se inician en la piel, inicialmente sin manifestaciones extracutáneas, aunque las mismas pueden desarrollarse en fases más avanzadas de la enfermedad. El grupo de los CTCL es muy heterogéneo histológica y molecularmente, incluyendo subtipos con cursos clínicos desde indolentes hasta muy agresivos. Todavía no se conocen con certeza los factores que desencadenan la enfermedad ni los mecanismos patogénicos que influyen en su desarrollo y curso; lo que conlleva a una falta de opciones de tratamiento efectivas. En la actualidad se suelen utilizar esteroides tópicos y fototerapia como tratamientos orientados a la piel, quimioterapia y anticuerpos monoclonales como tratamientos sistémicos. Hasta ahora, la única terapia curativa es el trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas provenientes de un donante sano, y se encuentran en desarrollo investigaciones enfocadas al desarrollo de nuevas terapias¹².

Los subtipos más comunes de CTCL son la Micosis Fungoide (MF) y el Síndrome de Sézary (SS). La MF es típicamente una enfermedad indolente que se presenta generalmente con parches y

placas limitados a la piel, aunque en aproximadamente un tercio de los casos ocurre una progresión al desarrollo de tumores de piel, eritrodermia, o afectación ganglionar o visceral. Si bien el SS se consideraba inicialmente como una progresión de la MF, actualmente se lo reconoce como una entidad separada. El SS es menos frecuente y se caracteriza por la presentación simultánea de eritrodermia, linfadenopatía generalizada y la presencia de células T neoplásicas (células de Sézary) en la piel, los ganglios linfáticos y la sangre periférica. Tiende a progresar más rápidamente y tiene peor pronóstico que la MF¹³.

1.2 Hormonas Tiroideas

Las hormonas tiroideas (HTs) son la tiroxina (T4) y la triyodotironina (T3). Ambas son hormonas derivadas del aminoácido tirosina, producidas y secretadas por la glándula tiroides, que cumplen importantes roles en la regulación del metabolismo. En la **Figura 5** se pueden observar las estructuras químicas de ambas hormonas.

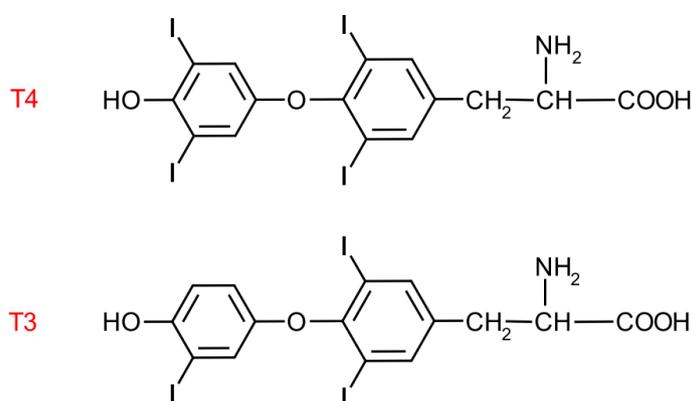


Figura 5: Estructuras químicas de las hormonas T4 y T3.

Entre las hormonas T4 y T3, se considera a esta última como la hormona “biológicamente activa”, debido a que es la forma con mayor afinidad a los receptores nucleares de HTs. La única diferencia entre T4 y T3 a nivel químico es la cantidad de átomos de yodo que se encuentran incorporados en la molécula; en tejidos periféricos del organismo la T4 puede transformarse en T3 a través de un proceso de 5'-desyodación del anillo externo mediado por enzimas denominadas desyodasas o deiodinasas.

1.2.1 Eje hipotalámico-hipofisario-tiroideo

El Eje hipotalámico-hipofisario-tiroideo (eje HPT) es un sistema de regulación hormonal compuesto por el hipotálamo, la hipófisis o glándula pituitaria, y la tiroides; es responsable del control del metabolismo y se encuentra esquematizado en la **Figura 6**. En resumen, la hormona liberadora de tirotrópina (TRH, del inglés *Thyrotropin-Releasing Hormone*) es producida en el hipotálamo, y viaja a través del sistema vascular porta-hipofisario hacia la hipófisis anterior. Allí, estimula la síntesis y liberación de la hormona estimulante de la tiroides (TSH, del inglés *Thyroid-Stimulating Hormone*), que es liberada al torrente sanguíneo. Cuando alcanza la glándula tiroides, la TSH actúa promoviendo la síntesis y liberación de T3 y T4. Estas dos últimas hormonas participan en un mecanismo de retroalimentación negativa del eje HPT, ya que niveles altos de T3 y T4 circulantes inhiben la producción de TRH y TSH en el hipotálamo y la hipófisis, respectivamente. De este modo, en condiciones fisiológicas se asegura que los niveles de HTs permanezcan en un rango óptimo.

Problemas en distintos puntos del eje HPT conllevan a una alteración del estado tiroideo, que puede ser de hipertiroidismo cuando los niveles hormonales están por encima de los normales o hipotiroidismo cuando se encuentran por debajo de los normales. Estas alteraciones pueden deberse a patologías primarias de la glándula tiroidea, o darse como efectos secundarios de patologías hipotalámicas o hipofisarias.

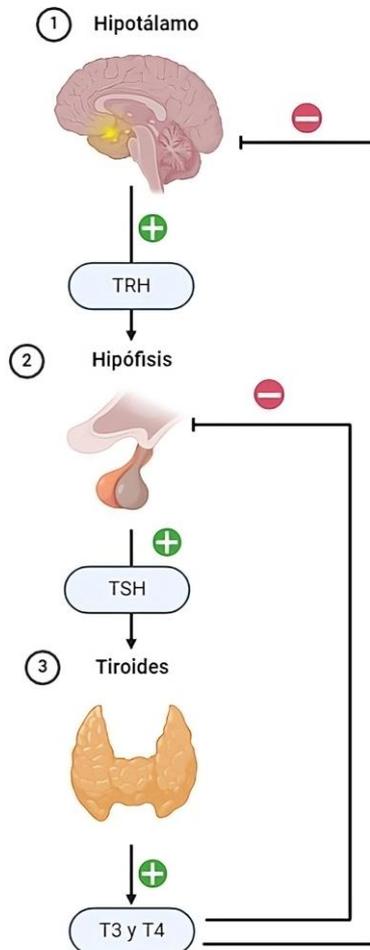


Figura 6: Representación de los órganos y hormonas que conforman el eje HPT.

Hormonas T3 y T4:

En circulación, las HTs se encuentran mayoritariamente unidas a las proteínas plasmáticas globulina fijadora de tiroxina (TBG, une tanto T4 como T3), prealbúmina fijadora de tiroxina (TBPA) y albúmina; mientras que una pequeña proporción se encuentra como hormona libre. Si bien las células foliculares tiroideas secretan tanto T3 como T4, la T3 también puede producirse en tejidos periféricos del organismo por desyodación T4 mediada por las enzimas desyodasas de tipo 1 (DIO1) y de tipo 2 (DIO2). DIO1 se encuentra expresada en la membrana plasmática, principalmente en hígado y riñón, mientras que DIO2 se ubica en la membrana del retículo endoplasmático en tejidos como tiroides, glándula pituitaria, cerebro, tejido adiposo, corazón y músculo esquelético. Por su amplia distribución, DIO2 es la principal proveedora de T3 a nivel intracelular. Otra enzima desyodasa, la DIO3, participa de la inactivación de las HTs retirando un átomo de yodo del anillo interno de la T4 para formar T3 reversa (rT3), la cual es inactiva biológicamente. La DIO3 también puede retirar un átomo de yodo tanto de la T3 como la rT3 para dar lugar a la diyodotirosina (DIT) también conocida como T2.

Isoforma	Une T3?	Capacidad de dimerizar	Diagrama de dominios
THRβ1	Sí	Sí	AF-1 DBD LBD AF-2
THRβ2	Sí	Sí	AF-1 DBD LBD AF-2
THRα1	Sí	Sí	AF-1 DBD LBD AF-2
THRα2	No	Sí	AF-1 DBD LBD

Figura 8: Isoformas principales de los TRs humanos. La isoforma TRα2 es incapaz de unir hormona debido a su dominio LBD truncado. Fuente: adaptado de Ortega-Carvalho et al. 2014

El dominio LBD es al cual se unen las hormonas T3 y T4, teniendo la primera una afinidad entre 10 y 15 veces mayor; además, este dominio es el responsable de la capacidad que tienen los TRs para formar homo y hetero-dímeros. El dominio DBD es el responsable de reconocer y unirse a los elementos de respuesta a hormonas tiroideas (TREs) que se encuentran en la región promotora de los genes regulados por HTs. Las funciones de los dominios AF-1 y AF-2 no se encuentran completamente esclarecidas, y se conoce que presentan una mayor diversidad de secuencias que los otros dominios.

Las secuencias de ADN que unen a los TR, denominadas elementos de respuesta a hormona tiroidea o TREs, suelen estar compuestas por repeticiones directas o invertidas del motivo "AGGTCA" o sus variantes, separadas por un determinado número de bases^{17,18}. Se han descrito en literatura tres patrones para los sitios de unión, que se muestran en la **Figura 9**:

- **DR4:** Consistente en dos repeticiones directas del motivo, separadas por 4pb.
- **Pal o IR0:** Consistente en dos repeticiones adyacentes del motivo, en sentido inverso.
- **IP6 o ER6:** Consistente en dos repeticiones inversas del motivo, separadas por 6pb.

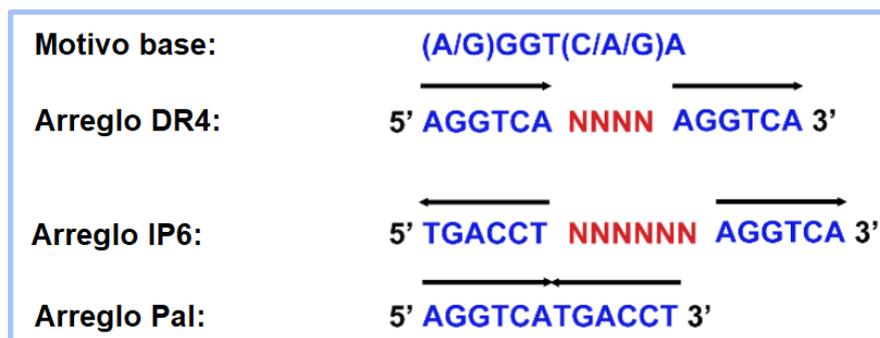


Figura 9: Sitios de unión para TRα y β descritos en literatura. Extraído de Liu et al. 2019, con adaptaciones

Debido a que el motivo "AGGTCA" es reconocido por múltiples receptores nucleares de hormonas (TR, VDR, RAR, PPAR, RXR), la orientación de las repeticiones y la separación entre ellas es lo que determina la especificidad para un dado receptor. Se ha descrito que otros arreglos de esta secuencia, denominados DR3 y DR5, actúan como elementos de respuesta a vitamina D y ácido retinóico respectivamente; mientras que el arreglo DR1 une tanto heterodímeros RAR/RXR como homodímeros de RXR^{19,20}.

Integrina $\alpha\beta3$:

La integrina $\alpha\beta3$ es una proteína de superficie que se expresa en osteoclastos, en células endoteliales y del músculo liso vascular en proceso de división, además de en numerosos tipos de células tumorales. Esta proteína interactúa con componentes de la matriz extracelular que poseen la secuencia RGD (arginina – glicina – ácido aspártico). También es conocida como “receptor de vitronectina” debido a que esta proteína de la matriz extracelular es su principal ligando, aunque también es capaz de unir fibronectina y fibrinógeno, entre otros.

Adicionalmente, se ha demostrado que la integrina $\alpha\beta3$ actúa como receptor de membrana de HTs en varios tejidos, constituyendo una vía por la cual las mismas ejercen sus efectos biológicos, adicional a la vía de los receptores nucleares²¹. El dominio de unión de HTs es cercano al dominio RGD y posee dos sitios de unión denominados S1 y S2, de los cuales el primero une exclusivamente T3 mientras que el segundo une ambas hormonas pero teniendo mayor afinidad por la T4; la señal se transduce activando distintas vías de señalización, dependiendo del sitio que haya unido la hormona²². Nuestro laboratorio ha demostrado la existencia de esta vía de señalización en LCTs, en los cuales la activación de la integrina $\alpha\beta3$ por las HTs resulta en una estimulación de vías de señalización relacionadas con el crecimiento²³.

1.2.3 Efectos biológicos de las hormonas tiroideas

Las HTs son esenciales para la regulación del metabolismo y para el correcto funcionamiento y desarrollo de numerosos procesos fisiológicos. Si bien estas hormonas ejercen efecto en todos los sistemas del organismo debido a la amplia expresión de sus receptores, la respuesta a HTs no es igual en todos los órganos dado que existe una expresión diferencial de los distintos tipos de receptores y enzimas desyodasas. Entre los principales efectos sistémicos de las HTs se encuentran la estimulación de la termogénesis y un aumento generalizado de la tasa metabólica causado por la inducción tanto de vías anabólicas como catabólicas, activando la síntesis de enzimas implicadas en los procesos de gluconeogénesis, lipogénesis, síntesis de proteínas, glucogenólisis, lipólisis y proteólisis. En algunos de sus tejidos diana, las HTs inducen un aumento en la expresión de los receptores β -adrenérgicos, potenciando así los efectos ejercidos por el sistema nervioso simpático: aumento de la frecuencia cardíaca, de la presión arterial, y de la ventilación.

Las HTs resultan esenciales durante la etapa fetal y los primeros años de vida, ya que intervienen en el desarrollo del sistema nervioso central, en la maduración pulmonar y cardíaca, y en el crecimiento y remodelación ósea²⁴. También participan en las funciones reproductivas en ambos sexos, influyendo en la síntesis y liberación de globulina fijadora de hormonas sexuales, la espermatogénesis y el ciclo ovárico²⁵.

1.2.4 Hormonas tiroideas como factor de proliferación de los linfomas T

Anteriormente, nuestro laboratorio ha mostrado que los niveles fisiológicos de HTs pueden estimular la proliferación in vitro de la línea celular BW5147 de LCT de ratón, a través de vías que involucran tanto a los receptores nucleares como a los de membrana y conducen a la activación de la proteína quinasa C, la MAP quinasa 1/2 (ERK1/2) y el factor nuclear NF- κ B²⁶.

Respecto a líneas celulares humanas, nuestro grupo ha comprobado en un panel de líneas de LCTs que tanto el receptor nuclear TR α como la integrina $\alpha\beta3$ son funcionales, que sus niveles de expresión son mayores a los existentes en células T normales, y que la activación de los mismos ante tratamientos de 24 horas con HTs produce incrementos del 30 a 50% en la

proliferación. Este incremento se mantiene cuando el tratamiento se realiza con HTs unidas a agarosa, que no pueden acceder al interior celular y por lo tanto están limitadas a interactuar con proteínas de membrana como la integrina $\alpha\beta3$, demostrando que la activación de este receptor de HTs es suficiente para desencadenar el efecto proliferativo. Finalmente, se ha demostrado que las HTs al actuar como ligandos para la integrina $\alpha\beta3$ inducen un programa transcripcional que estimula la supervivencia, activando vías de señalización relacionadas con el crecimiento y la angiogénesis (vías JAK-STAT y MAPK/ERK)²³. La activación de la vía JAK/STAT produce efectos aguas abajo relacionados con un mal pronóstico, como el aumento de la actividad de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9, que pudieron revertirse al incubar las células con el inhibidor de STAT3 (criptotanshinona) o con el inhibidor de integrina $\alpha\beta3$ (cilengitide)²⁷.

1.3 Canal de protones Hv1

El canal de H⁺ operado por voltaje 1 (Hv1), codificado en humanos por el gen *HVCN1*, es un canal iónico altamente selectivo para protones presente en diversos tipos celulares, cuya probabilidad de apertura depende del potencial de membrana y del gradiente de pH existente a través de la membrana celular. Se conocen tres variantes transcripcionales, de las cuales dos codifican para una proteína de 273 aminoácidos (denominada isoforma larga del canal), y la restante codifica para una proteína que carece de los primeros 20 aminoácidos del extremo N- terminal (denominada isoforma corta o truncada).

El canal Hv1 permite el pasaje de una corriente de H⁺ de manera pasiva desde el citoplasma hacia el espacio extracelular, contribuyendo a evitar la acidificación intracelular y la despolarización de la célula. Si bien su ubicación típica es la membrana plasmática, hay algunos reportes de localización en mitocondrias de linfocitos CD8⁺ y de células del túbulo distal en riñón^{28,29}.

1.3.1 Estructura del canal Hv1

La estructura del canal Hv1 está constituida por cuatro segmentos transmembrana (denominados TM1 a TM4) unidos por pequeños loops, con los extremos N- y C-terminal orientados hacia el citoplasma, como se muestra en la **Figura 10A**. A diferencia del resto de canales, en los cuales los iones circulan a través de un poro de permeación, el canal Hv1 no presenta un dominio de poro definido; el mecanismo de permeación de los H⁺ consiste en pasos sucesivos de protonación y desprotonación que permiten la translocación neta de H⁺ hacia el espacio extracelular.

En las células, el canal se encuentra formando dímeros, los cuales se mantienen unidos mediante interacciones de hélices superenrolladas (del inglés *coiled-coil interactions*) entre los dominios intracelulares C-terminal de ambos monómeros, tal como se representa en la **Figura 10B**. Como puede observarse, cada monómero posee su propia vía de conducción de H⁺ y se ha demostrado que el canal es funcional también en forma monomérica en sistemas de expresión heteróloga. El hecho de que las únicas porciones extracelulares del canal sean dos loops de pocos aminoácidos de longitud dificulta el hallazgo de anticuerpos que se unan al mismo desde el exterior celular.

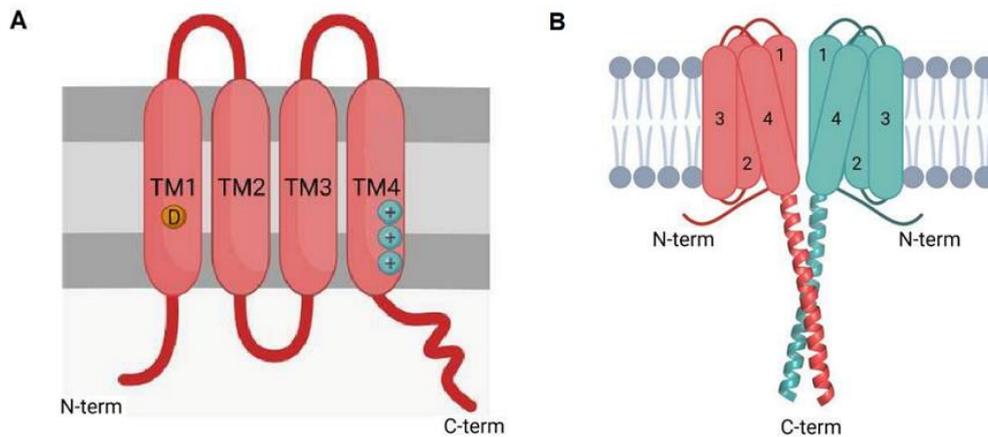


Figura 10: **A)** Estructura del canal Hv1, con sus cuatro segmentos transmembrana (TM1-TM4), y los extremos N- y C-terminal orientados hacia el interior celular. **B)** Esquemática de un dímero del canal Hv1, donde ambos monómeros se conectan mediante sus extremos C-terminales. Extraído de Delgado-Bermúdez et al. 2022, con modificaciones.

En la **Figura 10A** también se encuentran destacados algunos residuos especialmente importantes para la funcionalidad del canal: en el segmento TM1, el residuo Asp112 ha sido identificado como crítico para la selectividad del canal, mientras que el segmento TM4 posee tres residuos de arginina (aminoácidos con carga positiva) que se mueven en respuesta a cambios en el potencial de la membrana celular y resultan fundamentales en la sensibilidad al voltaje^{30,31}. Este movimiento del segmento S4 genera una vía hidrofílica de conducción de H⁺, en la que participan los segmentos (TM1-TM4), llevando al canal a su estado conductor.

1.3.2 Propiedades de la corriente mediada por el canal Hv1

Conductancia unitaria:

Uno de los parámetros que caracteriza al canal Hv1 es su extremadamente baja conductancia unitaria, la cual se estima en el orden de las decenas o cientos de fS (3 órdenes de magnitud por debajo de lo reportado para otros canales iónicos), siendo la conductancia unitaria más pequeña reportada hasta la fecha. Este hecho hace que no se puedan registrar corrientes de canal único.

Selectividad iónica:

Una de las características distintivas de este canal es su particularmente elevada selectividad iónica (presentando valores cercanos a 10^6 para la relación de permeabilidad entre el H⁺ y el Na⁺). Esta característica puede explicarse considerando el mecanismo de permeación de los H⁺, que, como mencionamos anteriormente, no atraviesan la membrana por un dominio de poro definido, sino que avanzan mediante sucesivos pasos de protonación y desprotonación.

Cinética de activación:

Las corrientes de H⁺ mediadas por este canal presentan una cinética de activación mucho más lenta que las de otros canales iónicos operados por voltaje. En este sentido, las constantes de activación reportadas para el canal Hv1 se encuentran en el rango de los segundos^{32,33}.

Dependencia del pH y del voltaje:

Otra propiedad a destacar del canal Hv1 es que su probabilidad de apertura es dependiente del gradiente de pH a través de la membrana plasmática y del potencial de membrana; incrementándose ante una despolarización de la misma, una disminución del pH intracelular o un aumento del pH extracelular³⁴.

Pese a ser una vía de transporte pasiva, en sistemas nativos el canal Hv1 solo media corrientes salientes de protones: desde el citoplasma hacia el espacio extracelular. Esto se debe a que el $V_{1/2}$ (potencial de membrana en el cual la mitad de los canales se encuentra en estado abierto) se desplaza notablemente hacia valores positivos cuando el pH extracelular disminuye o el interior celular se alcaliniza. Por este motivo, en situaciones donde el gradiente de pH se invierte, y el espacio extracelular se torna más ácido que el citoplasma, el canal se encuentra en estado cerrado a todos los valores de potencial de membrana fisiológicos. Por lo anterior, el canal Hv1 funciona como una válvula de escape de protones en las células, disipando cargas ácidas que puedan generarse en el citoplasma, sin permitir un eventual ingreso de H^+ que podría producirse en entornos ácidos, como el microambiente de tumores sólidos o situaciones inflamatorias.

Modulación del canal:

Se han reportado distintas moléculas que actúan como moduladoras de la actividad del canal, estimulando o inhibiendo las corrientes mediadas por el mismo. Recientemente, nuestro grupo ha descubierto que el ATP intracelular interactúa molecularmente con el canal Hv1, aumentando la amplitud de la corriente³⁵. Por otro lado, entre los inhibidores del canal se encuentran los cationes metálicos divalentes (principalmente Zn^{2+} , que se ha establecido como el *gold standard* para identificar si una corriente de H^+ es mediada por Hv1) y los compuestos derivados del 2-GBI (2-guanidinobenzimidazol), como el Cl-GBI^{36,37}.

1.3.3 Funciones fisiológicas descritas para el canal Hv1

Una de las funciones fisiológicas que se asigna a este canal es actuar asociado a la NADPH oxidasa en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), de especial importancia en células del sistema inmune. Las células fagocíticas (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, entre otras) tienen la capacidad de, al reconocer microorganismos patógenos, neutralizarlos mediante un proceso de fagocitosis e incorporarlos dentro de su vacuola fagocítica. El complejo NADPH oxidasa se encuentra en la membrana de estas células y su actividad transportadora de electrones conlleva a la producción de radicales libres, que son esenciales en el proceso de destrucción de los patógenos fagocitados³⁸. Tanto la despolarización de la membrana debida al transporte de electrones como la acumulación local de equivalentes de H^+ que se producen por la oxidación del NADPH pueden llevar a la inactivación de la enzima NADPH oxidasa, por lo cual resulta fundamental la actividad del canal Hv1, que al extruir H^+ hacia el medio extracelular produce un pasaje de cargas positivas en la misma dirección del transporte de e^- , compensando así la despolarización de la membrana y la acidificación local que suceden durante el estallido respiratorio^{39,40}. Un esquema de este proceso se puede observar en la **Figura 11**.

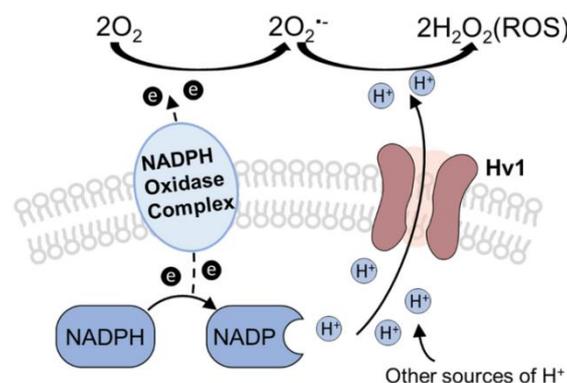


Figura 11: Esquemización de las estructuras involucradas en la producción de ROS Fuente: extraído de Shen et al. 2023

En linfocitos B, la estimulación del receptor antigénico (BCR) desencadena la producción de ROS por parte del complejo NADPH oxidasa ubicado en la membrana plasmática. Se ha demostrado que la presencia del canal Hv1 en la membrana plasmática es necesaria para que esta producción de ROS ocurra, y por lo tanto, este canal resulta esencial para la activación de los linfocitos B (un proceso de gran importancia en la inmunidad del organismo ya que es necesario para la producción de anticuerpos)⁴¹.

Por otro lado, estudios recientes indican que en linfocitos T normales el canal Hv1 participa del proceso de activación de los linfocitos T inexpertos (o *naive*), cuando una célula presentadora de antígenos (APC) exhibe en su complejo MHC un péptido antigénico específico y lo pone en contacto con el receptor TCR de la célula T. Dentro de las células T, las CD4+ (linfocitos T cooperadores o *helper*) y las CD8+ (linfocitos T citotóxicos) presentan diferentes patrones de expresión del canal, dando un indicio de que el canal cumple roles diferentes en ambos tipos celulares. De hecho, en linfocitos CD4+ la presencia del canal Hv1 es necesaria para evitar la apoptosis producto de una acidificación intracelular luego de su activación, mientras que en linfocitos CD8+, que cuentan con una alta expresión de Hv1 en mitocondria, el canal es esencial para mantener la función de esta organela. En ambos grupos una deficiencia en el canal Hv1 conduce a defectos en la proliferación celular y en las funciones efectoras relacionadas con la inmunidad (producción de citoquinas y actividad citotóxica)²⁸.

El canal Hv1 también cumple importantes roles en células no pertenecientes al sistema inmune: participa en el proceso de capacitación espermática, siendo la estructura responsable de la alcalinización del citoplasma que conduce a la activación de la motilidad espermática⁴², y participa en la regulación del pH citoplasmático en osteoclastos y fibroblastos cardíacos.

1.3.4 El canal Hv1 en células tumorales

La regulación del pH intracelular (pH_i) es esencial para la supervivencia celular, ya que muchas enzimas tienen un estrecho rango de pH dentro del cual su actividad es óptima, por lo tanto una desviación del mismo por fuera de esos valores puede afectar la capacidad de catalizar reacciones químicas vitales para la célula. Usualmente en la mayoría de tipos celulares el pH_i oscila entre 7,2 y 7,4. La acidificación intracelular es un evento temprano clave en la vía apoptótica intrínseca (también conocida como vía mitocondrial), conduciendo a una muerte celular programada⁴³.

Las células cancerosas suelen sufrir una desregulación metabólica conocida como efecto Warburg, que consiste en la metabolización de glucosa mediante la vía glucolítica aún en presencia de oxígeno disponible, y tiene como consecuencia una sobreproducción de especies ácidas⁴⁴. Para mantener la viabilidad celular, esta sobrecarga ácida debe compensarse con una mayor tasa de extrusión de H⁺ que la existente en células no patológicas, y es por esto que muchos transportadores de H⁺ se proponen como posibles blancos antineoplásicos⁴⁵. Teniendo en cuenta que el canal Hv1 puede actuar como una vía pasiva de extrusión de H⁺, es decir, que permitiría aliviar la acidificación producida en las células cancerosas sin implicar un gasto metabólico adicional, se postula que el mismo podría jugar un rol importante en la biología tumoral. La diferencia principal entre este canal y otros transportadores iónicos relacionados con la salida de H⁺ de la célula, como el intercambiador Na⁺/H⁺ (NHE1), el transportador de monocarboxilato (MCT4), el co-transportador Na⁺/HCO₃⁻ (NBC) y la V-ATPasa, es que el canal Hv1 no requiere de la presencia de otras especies iónicas ni de un gasto de ATP para llevar a cabo el transporte⁴⁶.

Otro aspecto que ilustra la relevancia del canal Hv1 en las patologías oncológicas es el hecho de que se encuentra sobreexpresado en diversos tumores sólidos; en cáncer colorrectal y de mama se ha demostrado que una mayor expresión de Hv1 se correlaciona con un peor pronóstico de la enfermedad y una menor supervivencia^{47,48}. Diversos trabajos han mostrado que la inhibición de la actividad del canal y/o la regulación negativa de la expresión transcripcional mediante siRNAs produce una disminución en las capacidades migratorias e invasivas en células tumorales de glioma, cáncer de mama y cáncer colorrectal^{47,49-51}. Por último, en células Jurkat (línea humana de leucemia linfoblástica aguda de células T inmaduras) se ha demostrado que la inhibición del canal Hv1 induce una acidificación celular que conduce a la muerte por apoptosis⁵², reforzando la idea de que este canal podría ser un prometedor blanco terapéutico en linfomas de células T.

1.3.5 Posible relación entre los niveles de HTs y el canal Hv1

La regulación fisiológica y farmacológica de este canal aún se desconoce en gran medida y, hasta el momento, no se han reportado regulaciones del canal a nivel transcripcional. En este trabajo, se realizó un análisis utilizando herramientas bioinformáticas mediante el cual evidenciamos tres posibles sitios de unión para los receptores nucleares de HTs en las regiones promotoras del canal (descrito en el capítulo **Resultados**).

En base a este hallazgo, junto a los estudios previos de nuestro grupo donde demostramos el rol de las hormonas tiroideas en la proliferación de líneas celulares derivadas de linfomas T y la importancia del canal Hv1 en patologías oncológicas, decidimos evaluar si la expresión o función del canal es regulada por las HTs.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En base a los antecedentes presentados, nuestra **hipótesis de trabajo** plantea que los niveles de HTs pueden modular la expresión génica y/o actividad funcional del canal de protones Hv1 en células tumorales de tipo T, lo que a su vez podría impactar en la proliferación y supervivencia de estas células tumorales. En consecuencia, el **objetivo general** de este trabajo es evaluar el efecto producido por concentraciones fisiológicas de HTs sobre la expresión y actividad del canal Hv1 en dos líneas celulares humanas derivadas de neoplasias hematológicas de origen T (Karpas299 y HuT78). Para ello proponemos los siguientes **objetivos específicos**:

- I. Caracterizar la expresión y función del canal Hv1 en dos líneas celulares derivadas de patologías oncológicas de origen T (Karpas299 y HuT78)
- II. Evaluar los efectos producidos por concentraciones fisiológicas de HTs sobre la expresión y función del canal Hv1 en las líneas celulares Karpas299 y HuT78

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cultivo de las líneas celulares HuT78 y Karpas299

Como se mencionó previamente, las líneas celulares que utilizamos como modelo para estudiar el linfoma de células T son HuT78 (línea celular de TCL cutáneo humano, del subtipo síndrome de Sézary) y Karpas299 (línea celular de linfoma anaplásico de células grandes, ALK+). Ambas líneas corresponden a células que crecen en suspensión. Las Karpas299 fueron obtenidas de Sigma-Aldrich y las HuT78 de ATCC (American Type Culture Collection).

Las células fueron cultivadas en medio RPMI 1640, suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, glutamina 2mM, y antibióticos (penicilina y estreptomina) en estufa a 37°C con una atmósfera húmeda de CO₂ al 5%. Las células se repicaron por dilución con el medio mencionado tres veces por semana, manteniendo de ese modo la concentración entre 0,5 y 1,5 x10⁶ células/mL. Cabe destacar que el SFB utilizado en cultivo (Sigma-Aldrich) posee una baja concentración de hormonas tiroideas, de modo de no interferir con los tratamientos realizados.

En ambas líneas celulares se realizaron tratamientos con concentraciones fisiológicas de HTs, de diferentes duraciones. Para ello, primeramente las células se cultivaron durante 24 horas en medio RPMI suplementado con glutamina y antibióticos pero en ausencia de SFB. Posteriormente, se sembraron alrededor de 1-2x10⁶ células por pocillo en placas de 6 o 12 pocillos, y se adicionaron hormonas (Sigma-Aldrich) disueltas en medio RPMI de modo de obtener una concentración final de 10⁻⁷M (100nM) de T4 y 10⁻⁹M (1nM) de T3. Para los controles, se realizó el tratamiento del modo descrito anteriormente, y se adicionó un volumen equivalente de RPMI sin hormonas.

Las células fueron levantadas transcurrido un tiempo determinado (3, 6, 24 o 48 horas) para posteriormente realizar los distintos experimentos. Para ello se resuspendió cada pocillo, se trasladó su contenido a un tubo Eppendorf de 1,5mL debidamente rotulado con la línea celular y el tratamiento, y se centrifugó durante 5 minutos a 400g. Luego, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en un medio adecuado para el análisis experimental posterior.

3.2 Evaluación de los niveles transcripcionales del gen *HVCN1*

3.2.1 Extracción y cuantificación del ARN

El ARN total fue extraído utilizando el kit comercial TriPure™ Isolation Reagent (ThermoFisher) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Resumidamente, el protocolo utilizado consistió en adicionar a temperatura ambiente 1 mL de TriPure™ Isolation Reagent cada 1 x 10⁶ células y dejar reposar al menos 5 minutos para que se produzca la homogeneización. Seguidamente se separaron las fases acuosa y orgánica adicionando 200 µL de cloroformo por cada mL de TriPure, incubando 15 minutos a temperatura ambiente, y centrifugando a 12000 g durante 15 minutos. Como el ARN permanece en la fase acuosa, la misma se reservó luego de la centrifugación, descartando la fase orgánica y la interfase. Se agregaron 500 µL de isopropanol por cada mL de TriPure y se incubó durante 10 minutos para precipitar el ARN, se centrifugó 10 minutos a 12000 g y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se realizó un lavado del pellet con etanol al 70% (1mL por cada mL de TriPure), se centrifugó a 8000 g por 7 minutos, se descartó el sobrenadante y se removió todo el etanol posible del pellet antes de resuspenderlo en agua estéril libre de ribonucleasas y almacenarlo a -80°C. Todas las centrifugaciones fueron realizadas a una temperatura de 4°C.

El ARN aislado fue cuantificado por espectrometría midiendo la absorbancia a 260nm con un equipo Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). La calidad de las muestras fue determinada observando las relaciones de absorbancia a 260/280 y 260/230 nm. Previo a realizar las mediciones, el ARN en solución acuosa se sometió a un calentamiento a 65°C por 5 minutos, para romper las estructuras secundarias y terciarias.

3.2.2 Retrotranscripción

Para realizar la retrotranscripción del ARN mensajero, se partió de 2 µg del ARN total. Como retrotranscriptasa se utilizó la enzima M-MLV RT, y como cebador se utilizó un oligo dT de 15 nucleótidos de longitud (AP Biotech). El ARN junto con enzima, cebador, dNTPs y buffer de trabajo fue incubado a 42 °C durante 30 minutos en un equipo Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems). Al finalizar, se realizó una dilución 1:5 del ADN complementario obtenido (cDNA) en agua estéril libre de ribonucleasas y se almacenó a -80°C.

3.2.3 qPCR

Por qPCR se evaluó cuantitativamente la expresión del gen *HVCN1*, mientras que el gen de referencia *RPL13A* se utilizó como control interno para la normalización de los datos. Como molde se utilizó el cDNA (cuya obtención por retrotranscripción se explica en la sección anterior). Las secuencias de los cebadores utilizados se muestran en la **Tabla 1**. El set de cebadores utilizado para el gen *HVCN1* no distingue entre las isoformas larga y corta del canal.

Sets de cebadores		Secuencia (5' → 3')	Tamaño del producto de PCR (pb)
<i>RPL13A</i>	F	CGCCCTACGACAAGAAAAAG	121
	R	TGGTACTTCCAGCCAACCTC	
<i>HVCN1</i>	F	CGTGGTGGTGGTCTCATTCA	66
	R	AGAGCCTCAAAGTGGTGCTC	

Tabla 1: Secuencias de los primers utilizados

Las reacciones qPCR fueron llevadas a cabo en un equipo 7500 (Applied Biosystems). Se utilizó la mezcla maestra comercial SYBR™ Select (Applied Biosystems), que posee todos los componentes necesarios para realizar la amplificación del cDNA y la detección del producto que se va sintetizando (enzima ADN polimerasa, dNTPs, MgCl₂, colorante SYBR Green que fluoresce al asociarse a la doble hélice de ADN, colorante ROX de referencia interna y buffer). El programa de amplificación utilizado se describe en la **Tabla 2**.

Etapas	Temperatura (°C)	Duración	Cantidad de ciclos
Etapas de desnaturalización	95	5 minutos	1

Etapa de amplificación	95	10 segundos	40
	60	15 segundos	
	72	30 segundos	
Curva de disociación (<i>melting</i>)	95	15 segundos	1
	60	1 minuto	
	95	30 segundos	
	60	15 segundos	
Tabla 2: Programa de amplificación utilizado en las reacciones de qPCR			

El análisis cuantitativo de la expresión génica se realizó por el método de $\Delta\Delta Ct$ ⁵³

3.3 Evaluación de los niveles proteicos del canal Hv1

3.3.1 Protocolo de marcación

Luego de realizar los tratamientos con HTs (descritos en la **sección 3.1**), las células fueron centrifugadas y lavadas dos veces con PBS frío. La fijación se realizó con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS, resuspendiendo las células con agitación constante para evitar aglutinamientos e incubando durante al menos 30 minutos. Una vez fijadas, las células se almacenaron en frío hasta el momento de realizar la marcación.

Posteriormente, se realizó un lavado con PBS y las células se permeabilizaron incubando con Tween-20 al 0,1% en PBS (PBS-T) a 4°C durante 30 minutos. Para proceder con la marcación, las células fueron incubadas durante 18 horas a 4°C con una dilución 1/25 del anticuerpo específico (anticuerpo anti-Hv1, producido en conejo, PA5-77462 ThermoFischer Scientific) en PBS-T. Luego, las células fueron lavadas dos veces con PBS-T e incubadas 45 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente con una dilución 1/200 del anticuerpo secundario (Anti-rabbit conjugado al fluoróforo FITC, producido en cabra, BD Biosciences 554020) en PBS-T. Finalmente, las células fueron lavadas con PBS-T y resuspendidas en PBS para realizar la adquisición. La intensidad de fluorescencia se determinó utilizando un citómetro de flujo BD Accuri C6.

Como controles, se utilizaron células que sólo fueron expuestas al anticuerpo secundario (grupo control negativo) y células que fueron expuestas sólo al vehículo (grupo autofluorescencia).

El anticuerpo primario utilizado se une al péptido (C)GDDYHTWNVNYKK, correspondiente a los residuos de los aminoácidos 32-44 del canal Hv1 en ratón, que presenta una buena conservación con la secuencia en humanos (11/13 aminoácidos idénticos) y que ha sido utilizado con éxito en muestras derivadas de ambas especies. Como se observa en la **Figura 12**, este péptido se encuentra en la región intracelular del canal, resultando entonces necesaria una permeabilización de las células previa a la incubación con el AC 1º. El anticuerpo no distingue entre las isoformas corta y larga del canal

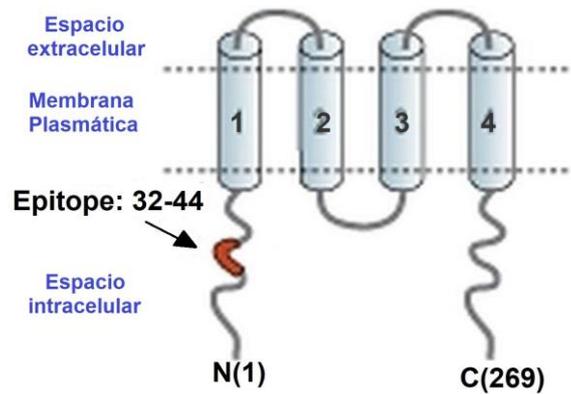


Figura 12: Estructura del canal Hv1, mostrando sus cuatro regiones transmembrana y el sitio de unión al anticuerpo utilizado en la citometría de flujo

3.3.2 Análisis de los resultados

En cada línea celular se utilizó el control de autofluorescencia para establecer una selección de eventos que permitiera excluir el ruido de la muestra (grumos de células, impurezas y restos de células lisadas) e incluir únicamente a las células individuales. La selección se realizó a partir de un gráfico de puntos de las variables SSC vs FSC, como se muestra en la **Figura 13A**, las cuales se relacionan con la complejidad y el tamaño de las células respectivamente. Posteriormente, se adquirieron el resto de muestras de modo que acumularan al menos 10.000 eventos dentro de la región P1. Finalmente, para comparar entre los distintos grupos de estudio, se graficaron histogramas de fluorescencia de los eventos incluidos en la región P1, utilizando el canal adecuado del citómetro (en nuestro equipo, el canal FL1 corresponde a la longitud de onda del fluoróforo FITC). Se utilizó el programa BD Accuri C6, diseñado específicamente para el citómetro de flujo empleado.

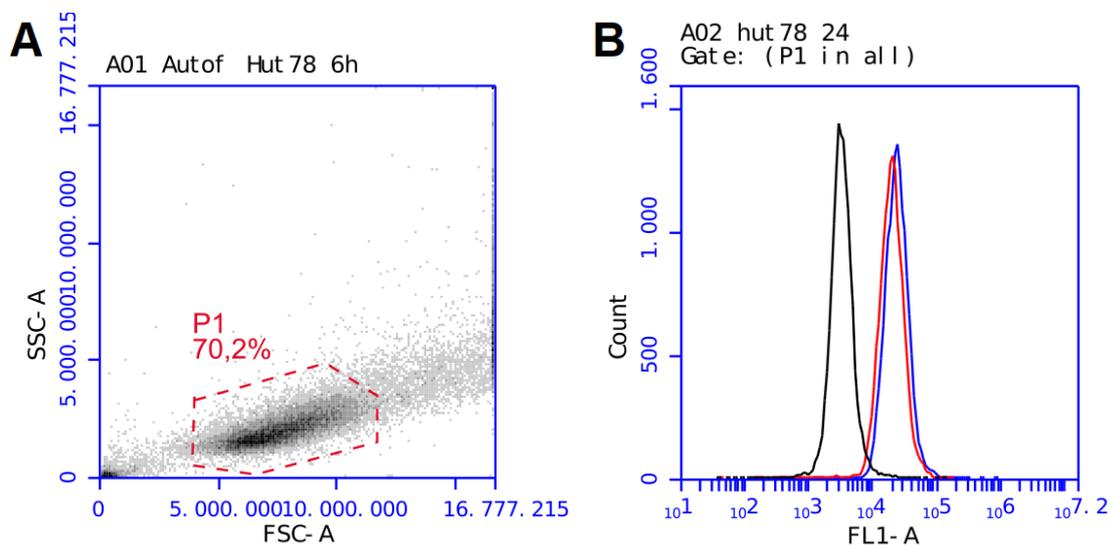


Figura 13: (A) Gráfico de puntos de las variables SSC vs FSC utilizado para establecer la región de análisis P1 en la línea celular HuT78. Se incluyen sólo los eventos correspondientes a células en estado singlete, excluyendo al debris celular (presente en la esquina inferior izquierda) y a los grumos o agrupaciones de varias células (ubicados en el lateral derecho) (B) Ejemplo de un histograma de intensidad de fluorescencia, en el cual se muestra el control negativo en el cual no se utilizó anticuerpo primario (pico negro), el tratamiento con vehículo (pico azul) y el tratamiento con HTs (pico rojo), ambos marcados con el anticuerpo anti-Hv1.

Para realizar comparaciones cuantitativas entre distintos tratamientos (HTs vs vehículo) sobre una misma línea celular, se determinaron las medias de fluorescencia del histograma para cada tratamiento. En los casos en los que se realizó una comparación entre las líneas celulares HuT78 y Karpas299, se determinó para cada una de ellas la resta entre la media de fluorescencia correspondiente al fluoróforo y la media de fluorescencia correspondiente al control negativo, para compensar las posibles diferencias en el pegado inespecífico del AC y/o la fluorescencia inherente a cada línea.

3.4 Evaluación de la actividad del canal Hv1

3.4.1 Introducción a la técnica de Patch-Clamp

La actividad del canal Hv1 en ambas líneas celulares, luego de su tratamiento con concentraciones fisiológicas de HTs o vehículo durante 48 horas (descritos en la **sección 3.1**), se determinó mediante la técnica de Patch-Clamp. Esta técnica permite medir corrientes iónicas de transmembrana manteniendo el potencial de membrana en valores prefijados, siendo por lo tanto la metodología ideal para estudiar canales iónicos. Debido a que la metodología del Patch-Clamp presenta una alta complejidad y requiere un largo tiempo de entrenamiento, los registros experimentales fueron realizados por la Dra. Clara Ventura, co-directora de este trabajo.

Para realizar las mediciones, se colocaron alícuotas de células en cámaras de Petri, previamente lavadas con alcohol, con el fin de facilitar la adherencia de las células al fondo de la placa. La técnica de Patch-Clamp consistió en la aproximación de una pipeta de vidrio a la superficie de la membrana de la célula elegida, utilizando para este fin un micromanipulador; una vez establecido el contacto con la célula, se aplicó una succión desde la pipeta, estableciendo un sello de alta resistencia de aproximadamente $1\text{ G}\Omega$ entre el vidrio de la misma y la membrana celular. De esta forma, se accedió a la configuración de célula adherida (en inglés *Cell Attached*, CA), representada en la **Figura 14A**, a partir de la cual puede accederse a otras configuraciones. En este trabajo, dada la extremadamente baja conductancia unitaria del canal Hv1, se utilizó la configuración de célula entera (en inglés *Whole Cell*, WC), que permite registrar la corriente mediada por todas las copias del canal presentes en la célula, tal como se muestra en la **Figura 14B**. El acceso a la configuración WC se logró, luego de generar el sello de alta resistencia, aplicando una presión negativa desde la pipeta, que permitió escindir la porción de membrana delimitada por el área de la misma.

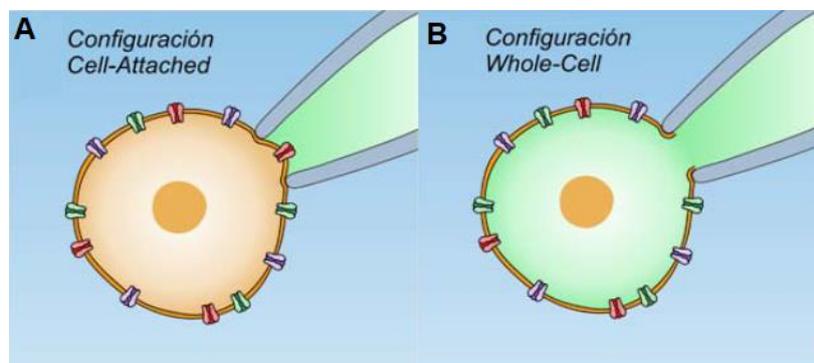


Figura 14: Ilustración de las configuraciones de Patch-Clamp **A)** Configuración *Cell Attached*, que permite registrar las corrientes de los canales iónicos presentes en la porción de membrana bajo la punta de la pipeta **B)** Configuración *Whole Cell*, que permite registrar las corrientes de la totalidad de los canales expresados en la membrana celular.

Las pipetas se fabricaron en el momento a partir de capilares de vidrio diseñados especialmente para esta técnica (PG52165-4, WPI, Boca Raton, Florida, EE. UU.) utilizando un equipo

Micropipette Puller (PP-83, Narishige, Tokio, Japón). Las resistencias de las pipetas estuvieron en el rango de 2-4MΩ. Cada pipeta se utilizó para realizar las determinaciones en una única célula, luego de lo cual se procedió a su descarte. A su vez, cada cámara experimental con su respectiva muestra celular se utilizó para realizar los experimentos de medición de corriente en una única célula, luego de lo cual se procedió a su descarte y se prosiguió con las medidas en una nueva cámara experimental.

La pipeta de vidrio se colocó en un dispositivo de soporte provisto de un electrodo de Ag/AgCl (electrodo de medida) sumergido en la solución contenida por la pipeta. Se colocó otro electrodo (electrodo de tierra, o de referencia) en una solución rica en Cl⁻, conectada mediante un puente salino con el baño extracelular. De esta forma, en la configuración WC, se logró que la solución de la pipeta dialice la célula y se establezca una conexión eléctrica entre el electrodo y el interior celular; se muestra un esquema del equipo en la **Figura 15**. El electrodo se encuentra conectado a un amplificador operacional utilizado en modo de fijación de voltaje, que mide el potencial de la membrana celular, lo compara con el valor de potencial deseado por el operador y aplica una corriente de igual magnitud y sentido contrario, permitiendo fijar el valor de potencial celular en el valor buscado.

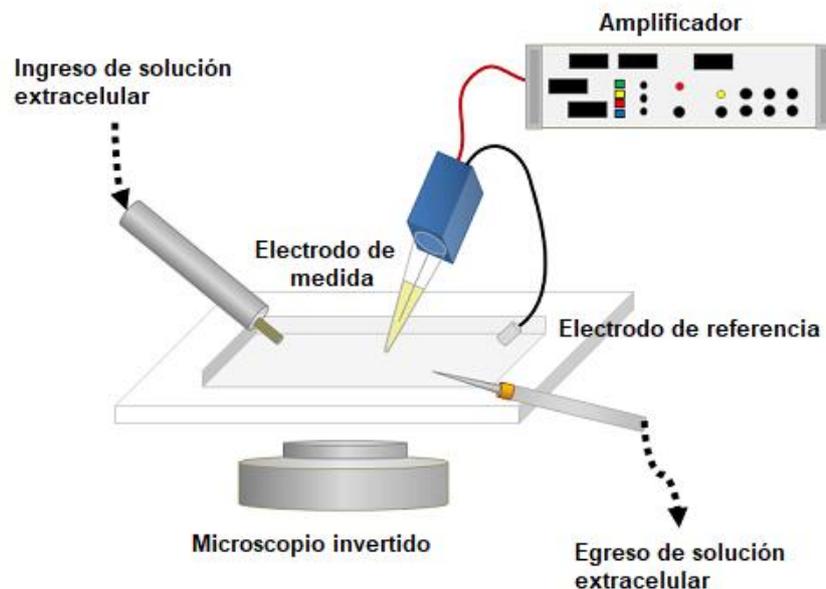


Figura 15: Esquema de un equipo típico utilizado durante la técnica de Patch-Clamp.

Para registrar las corrientes de H⁺ mediadas por el canal Hv1 se utilizaron las soluciones cuya composición se detalla a continuación. En ellas, el H⁺ es el único ion permeante, y las soluciones se encuentran fuertemente tamponadas con el objetivo de que las mismas corrientes de protones no produzcan un cambio en el pH en la proximidad del canal, alterando de esta manera la fuerza impulsora para las mismas. Las soluciones extracelulares a ensayar fueron perfundidas en la cámara experimental por gravedad con una pipeta multivía, mientras que la solución intracelular ingresó a la célula mediante la pipeta de vidrio, como se describió anteriormente.

Solución Extracelular 1 (SE1): HEPES 100 mM, NMDG 90 mM, MgCl₂·6H₂O 2 mM, EGTA 1 mM, pH ajustado a 7,8 con HCl.

Solución Extracelular 2 (SE2): HEPES 100 mM, NMDG 90 mM, MgCl₂·6H₂O 2 mM, EGTA 1 mM, pH ajustado a 7,2 con HCl.

Solución Intracelular (SI): MES 100 mM, NMDG 90 mM, MgCl₂·6H₂O 2 mM, EGTA 1 mM, pH ajustado a 6,3 con HCl.

Siendo HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico, NMDG: N-metil-D-glucamina, EGTA: ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N'-tetracético, MES: Ácido 2-morfolino etanosulfónico.

En algunos experimentos, la **SI** fue ajustada a un pH 5,5 y/o se le adicionó ATP en concentración 5 mM, con el objetivo de incrementar la corriente mediada por el canal. Del mismo modo, en algunos experimentos se adicionó Cl-GBI a las **SE**, con el objetivo de inhibir la corriente mediada por el canal.

Las células se observaron con un microscopio invertido estabilizado mecánicamente (Telaval 3, Carl Zeiss, Jena) equipado con una lente objetivo de 40x, dotado de una cámara de Faraday para filtrar los ruidos eléctricos del ambiente. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Las corrientes iónicas se midieron con un amplificador operacional (Axopatch 200A, Axon Instruments, Foster City, California, EE. UU.), se filtraron a una frecuencia de 2 kHz, se digitalizaron (Digidata 1440, Molecular Devices, LLC. Orleans Drive Sunnyvale CA, EE. UU.) a una frecuencia de muestreo de 10 kHz y se almacenaron en el disco duro de una computadora para su posterior análisis.

3.4.2 Protocolos de medida

Partiendo de un potencial de reposo de -40mV, se aplicaron pulsos de voltaje de 4 segundos de duración a +40mV, retornando luego al potencial de mantenimiento de -40 mV. Estos pulsos se aplicaron sucesivamente, separados por un período de 30 segundos para dar tiempo a la solución **SI** proveniente de la pipeta de dializar la célula y evitar la depleción de protones en el interior celular. Mediante este protocolo de voltaje, se registró la corriente de H⁺ evocada por el canal a +40 mV en función del tiempo. En la **Figura 16** se muestra una corriente típica acompañada del protocolo de voltaje. Como puede observarse, la corriente se incrementa en forma tiempo-dependiente alcanzando un estado estacionario alrededor de los 4 segundos.

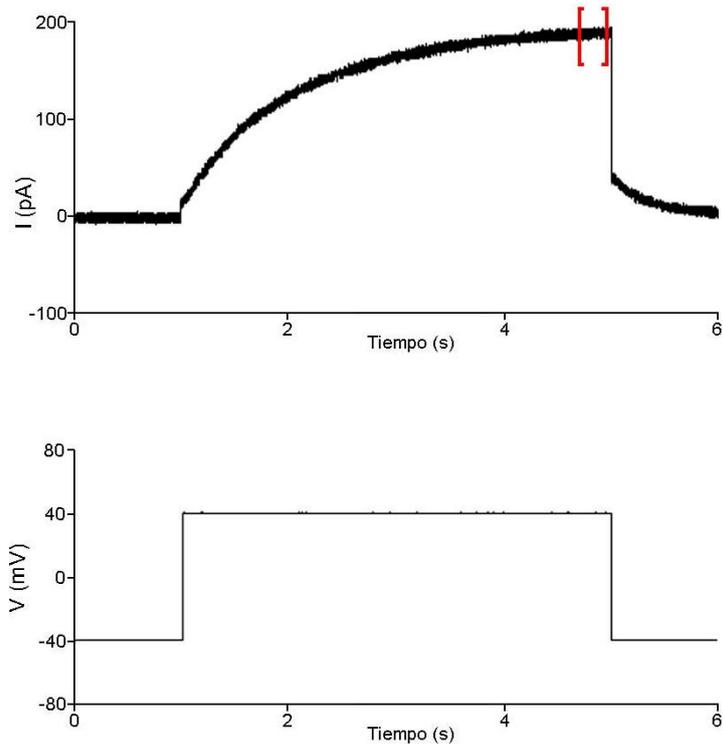


Figura 16: Visualización de un registro característico de la corriente de protones mediada por el canal Hv1 (arriba) y del protocolo de voltaje utilizado (abajo) en el programa de análisis Clampfit. Se indica entre corchetes rojos la región del registro utilizada para calcular la corriente

El protocolo anteriormente descrito se aplicó repetidas veces hasta observar que la corriente registrada permanecía constante en función del tiempo. Para ello, se cuantificó la magnitud de la corriente en estado estacionario mediante la medición del valor promedio de corriente en los últimos 100 ms del pulso (sección delimitada entre corchetes rojos en la **Figura 16**), y se graficó este parámetro en función del tiempo, como se muestra en la **Figura 17**. Como puede observarse, al inicio del registro la corriente es nula o variable hasta que la solución de registro (SE) llena la placa. En ese momento comienza a observarse una corriente mediada por el canal Hv1, que rápidamente se estabiliza.

Curso temporal - Pulsos a +40mV

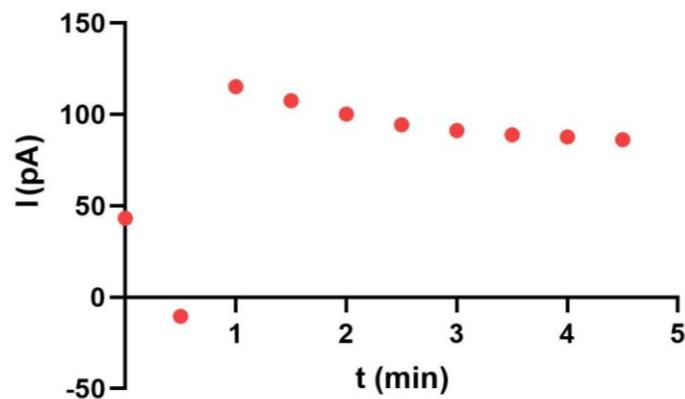


Figura 17: Ejemplo de la evolución temporal de la corriente de H^+ mediada por el canal Hv1 en células HuT78. Los pulsos de voltaje se aplicaron cada 30 segundos durante 5 minutos y se graficó la corriente en estado estacionario en función del tiempo. Se observa la estabilización de la corriente, luego de aproximadamente 3 minutos y medio.

Luego de la estabilización de la corriente, se procedió a registrar la curva corriente-voltaje (I-V). Este protocolo consiste en aplicar pulsos de voltaje de 5 segundos de duración desde un potencial de -40 hasta +40mV, con incrementos de a 5 mV. En todos los casos se partió de un potencial de mantenimiento de -40 mV y se retornó al mismo potencial luego de aplicar los pulsos. El intervalo de tiempo entre pulsos fue de 10 segundos. En la **Figura 18** se observan superpuestas las corrientes típicas para el protocolo utilizado.

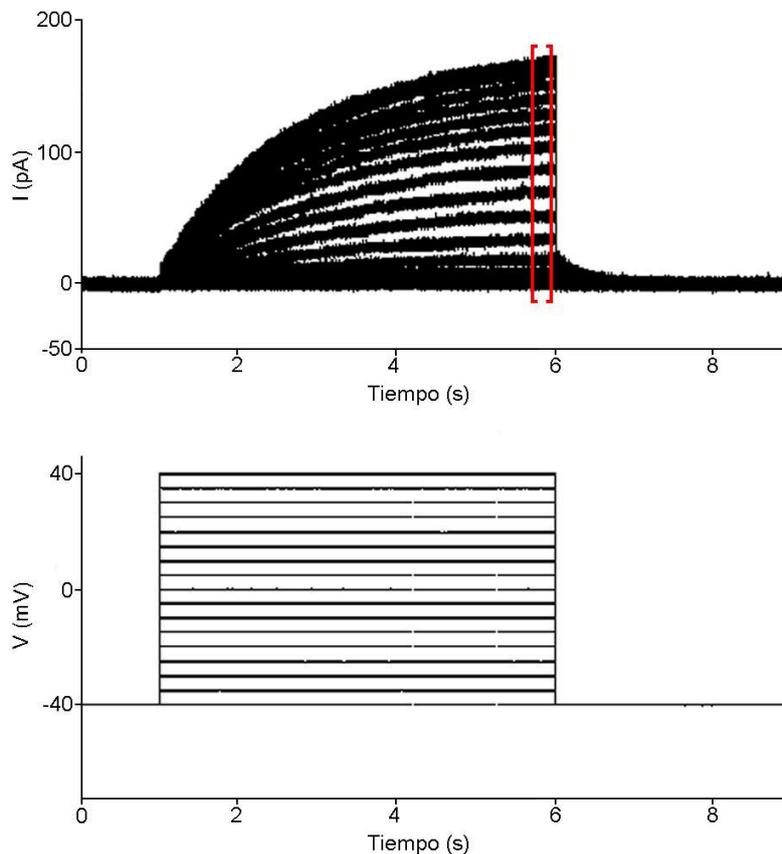


Figura 18: Visualización de un registro característico de las corrientes de protones mediadas por el canal Hv1 (arriba) al aplicar un protocolo con pulsos de voltaje a distintos potenciales (abajo) en el programa de análisis Clampfit. Se señala entre corchetes rojos la región del registro utilizada para construir las curvas I-V

3.4.3 Análisis de los registros

La visualización y análisis de las corrientes registradas se realizaron utilizando el programa Clampfit 10.7 (Molecular Devices) como se muestra en las **Figuras 16 y 18**.

Como se mencionó anteriormente, en este trabajo estudiamos la corriente mediada por el canal Hv1 en la configuración de célula entera (*Whole Cell, WC*), por lo que trabajamos con una corriente macroscópica. En esta configuración, la corriente observada en estado estacionario depende de la conductancia macroscópica de las células y de la fuerza impulsora aplicada:

$$I = G (V - E_{H^+})$$

donde **I** es la corriente en estado estacionario, **G** es la conductancia macroscópica, **V** es el voltaje aplicado y **E_{H+}** es el potencial de Nernst para H⁺, el cual depende únicamente de las concentración de H⁺ a ambos lados de la membrana.

Debido a que en nuestros experimentos de registro de corrientes utilizamos soluciones intracelulares y extracelulares con un pH fijo, el E_{H^+} permanece constante. Por lo tanto, realizar un gráfico de la magnitud de corriente en función del voltaje aplicado (que denominamos “curva I-V”) puede revelar cambios en la conductancia macroscópica (G).

La G depende a su vez de la conductancia unitaria del canal (γ), la cual es constante para un dado canal iónico, del número de canales presentes en la membrana (N) y de la probabilidad de apertura del canal (P_o), que en el canal Hv1 depende, como mencionamos anteriormente, del voltaje de la membrana y del gradiente de pH a través de la membrana.

$$I = \gamma N P_o (V - E_{H^+})$$

Por lo tanto, un análisis de las curvas I-V permite evidenciar cambios en el número de canales presentes en la membrana o en su probabilidad de apertura.

3.5 Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico de los datos experimentales se utilizó el software estadístico GraphPad PRISM (v8.0.2). Para determinar la existencia de una diferencia significativa entre los grupos experimentales se realizó el test de Student de dos colas no pareado o el test de Student de una muestra, según correspondiese. Uno de los supuestos del test de Student es que ambos grupos a comparar siguen una distribución normal, por lo que para comprobar este supuesto, se realizó la prueba F de análisis de varianza. La diferencia entre las medias se consideró significativa en los casos en que $P < 0,05$ y los resultados se expresaron como *media \pm SEM* (error estándar de la media). Para determinar si dentro de los datos experimentales existían valores atípicos, se utilizó la prueba ROUT para *outliers* fijando el valor del coeficiente Q en 1%.

3.6 Análisis bioinformático

Como parte de la exploración de factores que pudieran influir en la regulación transcripcional del gen *HVCN1* en humanos, se realizó un análisis del promotor de este gen en búsqueda de secuencias específicas de unión para factores de transcripción. Para ello, se utilizó la base de datos Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>) con el objetivo de obtener la secuencia de las regiones del gen anotadas como promotoras. Por otro lado, se utilizó la base de datos JASPAR 2024 (<https://jaspar.elixir.no/>) para obtener las matrices de frecuencia de posición (MFP) correspondientes a los factores de transcripción a evaluar. Estas matrices contienen, para cada interacción entre el ADN y un factor de transcripción dado, la probabilidad de hallar cada uno de los nucleótidos en cada posición. Finalmente, se escanearon las secuencias promotoras del gen del canal en busca de coincidencias con las matrices de pesos posicionales seleccionadas⁵⁴.

Las MFPs se representan gráficamente en forma de logos de secuencias, que muestran mediante el tamaño de cada columna de letras el contenido de información de cada posición (una posición donde puede encontrarse al azar cualquier base es una posición que no contiene información, mientras que una posición donde se encuentra una base conservada es una región informativa). Por otra parte, el grado de conservación de los nucleótidos para cada posición se representa mediante el tamaño de cada letra dentro de una columna. En este caso, un mayor tamaño relativo de la letra indica una mayor frecuencia de esa base en esa posición. Por convención, las bases con mayor probabilidad de aparición se representan en la parte superior de la columna, y las que aparecen con menor frecuencia se ubican en la parte inferior, como se ejemplifica en la **Figura 19**.

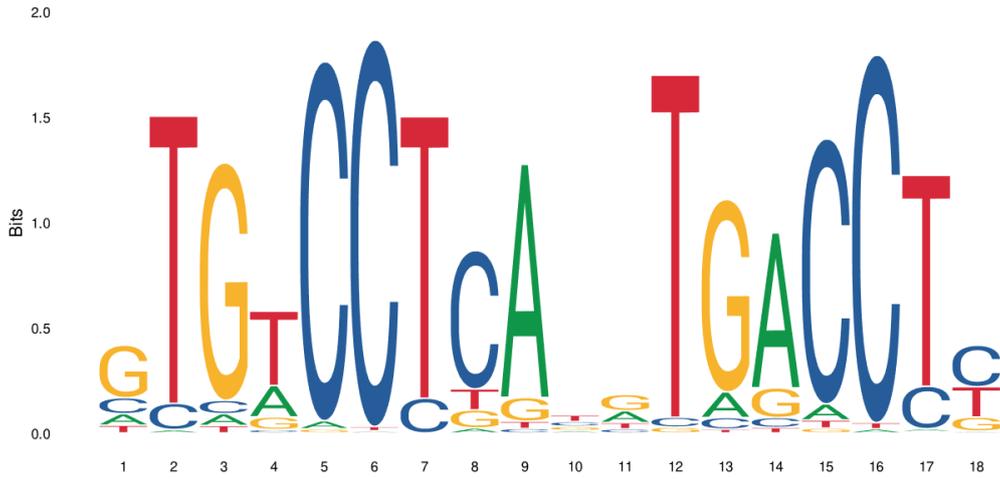


Figura 19: Ejemplo de un logo de secuencias, se muestra el correspondiente al sitio de unión para el factor de transcripción TR α

Factores de transcripción	ID de la matriz	Logo de secuencias
TR α	MA1969.2	
TR β	MA1576.2	
	MA1575.2	

	MA1574.2	
<p>Tabla 3: MFPs para los receptores TRα y TRβ presentes en la base de datos JASPAR 2024. La matriz MA1574.2 no se utilizó en el análisis</p>		

En este trabajo se utilizaron MFPs correspondientes a los sitios de unión para receptores nucleares de hormonas tiroideas TR α y β . La base de datos JASPAR presenta 4 MFPs para estos receptores, las cuales se muestran en la **Tabla 3**. Se realizó un curado de las mismas basado en las secuencias descritas en bibliografía para estos sitios de unión. Finalmente, decidimos trabajar con 3 MFPs (MA1969.2, MA1576.2 y MA1575.2) y descartar a la matriz MA1574.2, ya que la misma corresponde a un arreglo DR1 que, como se describió en la **sección 1.2.2**, no coincide con los sitios descritos en literatura para TR α y β . En caso de que se identifique un posible sitio de unión a factores de transcripción, la plataforma devuelve los resultados en forma de una tabla donde se indica la secuencia de unión predicha, su posición dentro de la secuencia que se introdujo como *input* para el análisis, en qué hebra (+ ó -) se encuentra, y las puntuaciones absoluta y relativa que se adjudican a ese sitio de unión. La puntuación absoluta (W) para cada sitio de unión predicho se calcula mediante la fórmula:

$$W = \log (P(\text{Site}|\text{Matrix}) / P(\text{Site}|\text{Background}))$$

donde $P(\text{Site}|\text{Matrix})$ es la probabilidad de hallar esa secuencia dadas las frecuencias en la MFP, y $P(\text{Site}|\text{Background})$ es la probabilidad de hallar esa secuencia considerando las frecuencias descritas por un modelo de fondo.

Como los valores que puede tomar la puntuación W dependen del tamaño de la matriz utilizada, se introduce una puntuación relativa (S_{rel}), que se calcula como:

$$S_{rel} = (W - \min) / (\max - \min)$$

donde \min y \max son las puntuaciones mínima y máxima que pueden obtenerse para una determinada matriz. De este modo, las puntuaciones se expresan en una escala que va de 0 a 1, donde el umbral por defecto que utiliza JASPAR es 0,8. En el análisis realizado en este trabajo, se utilizó un umbral de 0,825.

4. RESULTADOS

4.1 Expresión y actividad del canal Hv1 a nivel basal

En este trabajo, evaluamos los efectos producidos por concentraciones fisiológicas de HTs sobre la expresión y actividad del canal Hv1 en dos líneas celulares derivadas de PTCL. Para ello, comenzamos por realizar una caracterización de la expresión y actividad basales del canal en nuestras líneas celulares de trabajo.

4.1.1 Evaluación de la actividad del canal Hv1 en líneas celulares derivadas de linfomas T

En primer lugar, evaluamos la funcionalidad del canal en ambas líneas celulares mediante la técnica de Patch-Clamp. Para ello, realizamos curvas I-V, utilizando una solución intracelular de pH 6,3 (SI) y una solución extracelular de pH 7,8 (SE1). En estos ensayos, observamos la presencia de corrientes salientes de H⁺ dependientes de voltaje en células HuT78, pero no así en Karpas299; los resultados se grafican en la **Figura 20**.

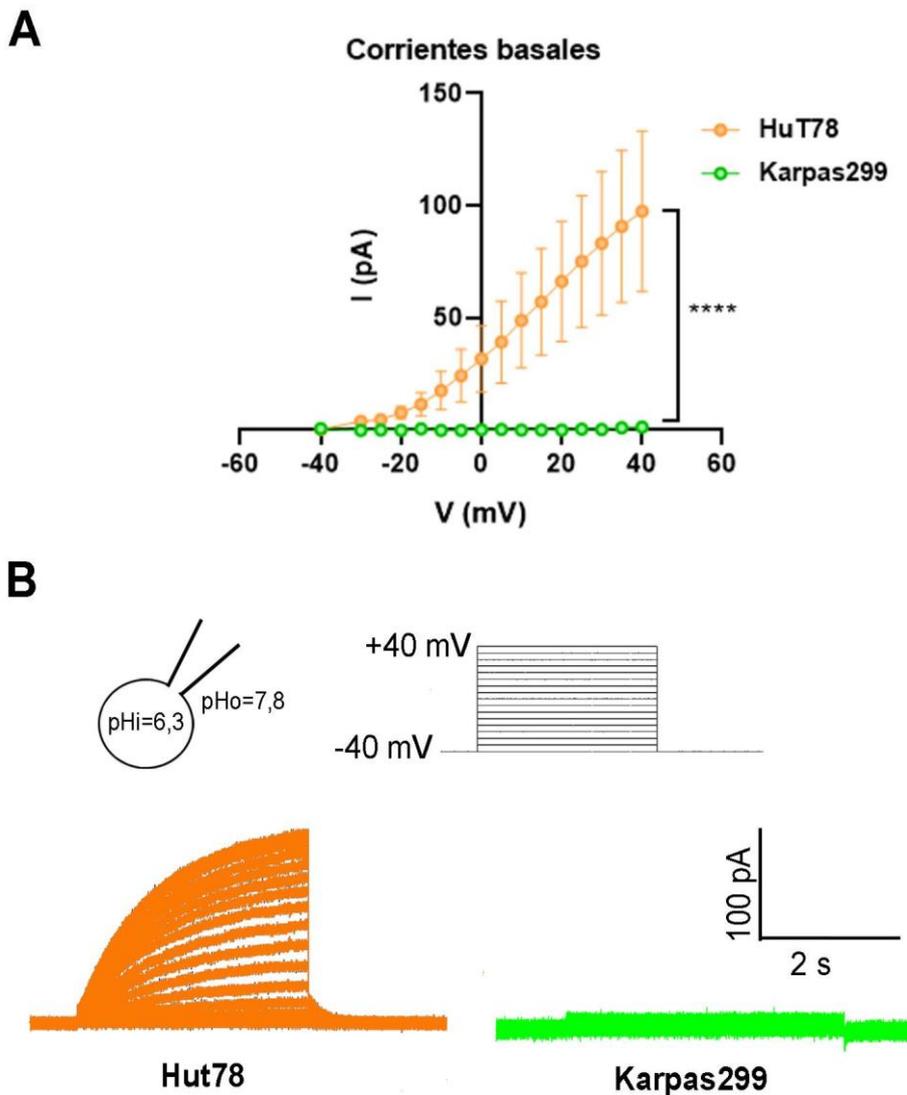


Figura 20. Corrientes basales mediadas por el canal Hv1 en células HuT78 y Karpas299. La corriente fue determinada mediante la técnica de Patch-Clamp, en la configuración de célula entera, con un gradiente de 1,5 unidades de pH a través de la membrana celular. **A)** Se muestra la media \pm SEM de los valores de corriente en función del voltaje

aplicado (curva I-V) en células HuT78 (n = 8) y Karpas299 (n = 4). Para el análisis estadístico, se realizó un test de Student de dos colas para muestras no pareadas a cada valor de voltaje analizado, ****p<0,0001 para voltajes iguales o mayores a -20 mV. **B)** Esquema representando la configuración y las concentraciones de H⁺ utilizadas en la técnica de Patch-Clamp, el protocolo de voltaje aplicado, y corrientes representativas obtenidas en ambas líneas celulares.

La sensibilidad al pH es una propiedad del canal Hv1, caracterizada por una marcada dependencia de su probabilidad de apertura (y por lo tanto, de la corriente macroscópica medida) con el gradiente de pH transmembrana. Para evaluarla, se determinó la corriente mediada por el canal empleando la configuración y protocolos descritos anteriormente, y utilizando soluciones de diferente pH en el medio extracelular. De este modo, se registró la corriente utilizando una solución intracelular con un pH fijo en 6,3 (solución **SI**) y soluciones extracelulares de pH 7,8 o 7,2 (soluciones **SE1** y **SE2**).

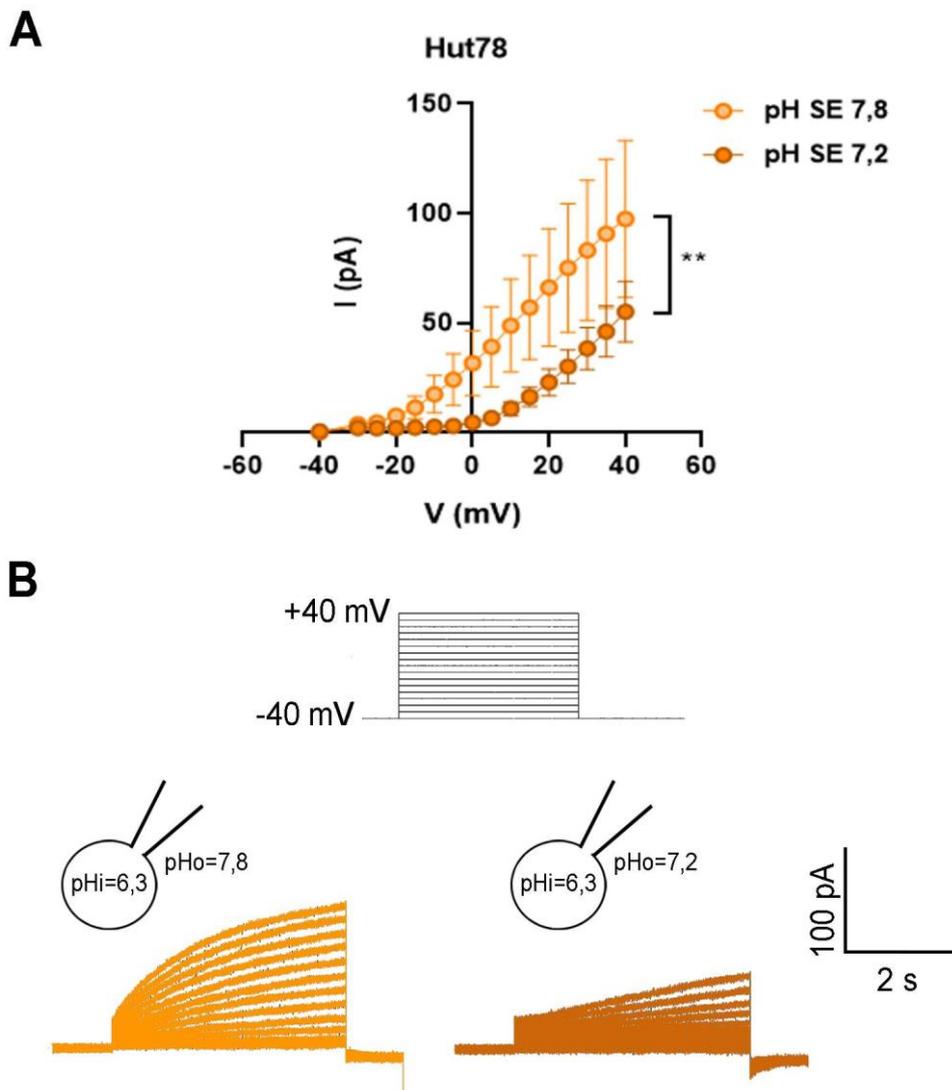


Figura 21. Efecto del gradiente de pH a través de la membrana plasmática sobre las corrientes basales mediadas por el canal Hv1 en células HuT78. La corriente fue determinada mediante la técnica de Patch-Clamp, en la configuración de célula entera, con una solución intracelular de pH 6,3 y una solución extracelular de pH ajustado a 7,8 ($\Delta\text{pH} = 1,5$) o a 7,2 ($\Delta\text{pH} = 0,9$). **A)** Se muestra la media \pm SEM de los valores de corriente en función del voltaje aplicado (curva I-V) al utilizar una SE de pH 7,8 (n = 8) o de pH 7,2 (n = 11). Para el análisis estadístico, se realizó un test de Student de dos colas para muestras no pareadas a cada valor de voltaje analizado. **p<0,01 para voltajes entre -10 y 30 mV **B)** Esquema representando la configuración y las concentraciones de H⁺ utilizadas en la técnica de Patch-Clamp, el protocolo de voltaje aplicado, y corrientes representativas obtenidas en ambas condiciones experimentales.

Como puede observarse, al disminuir el gradiente de pH entre los compartimentos intra y extracelulares, la curva I-V se desplaza hacia valores más positivos de voltaje. Es decir, para un mismo pulso de voltaje aplicado, la corriente evocada es mayor cuanto mayor es el ΔpH . Este resultado está de acuerdo con las propiedades descritas para la probabilidad de apertura (P_o) del canal, contribuyendo a corroborar la identidad de estas corrientes como mediadas por canales de tipo Hv1.

Otro enfoque que utilizamos para constatar que las corrientes observadas en la línea celular HuT78 fueran mediadas por el canal Hv1 fue administrar en la solución extracelular un inhibidor del mismo, y observar los efectos que esta aplicación produjo en la corriente macroscópica medida. Los resultados se exponen en la **Figura 22**, evidenciándose que la magnitud de la corriente (inicialmente 40 pA) disminuye luego del agregado de Cl-GBI en una concentración de 200 μM , aumenta ligeramente cuando se perfunde la cámara experimental con vehículo, y vuelve a disminuir cuando se administra una concentración mayor del inhibidor (500 μM).

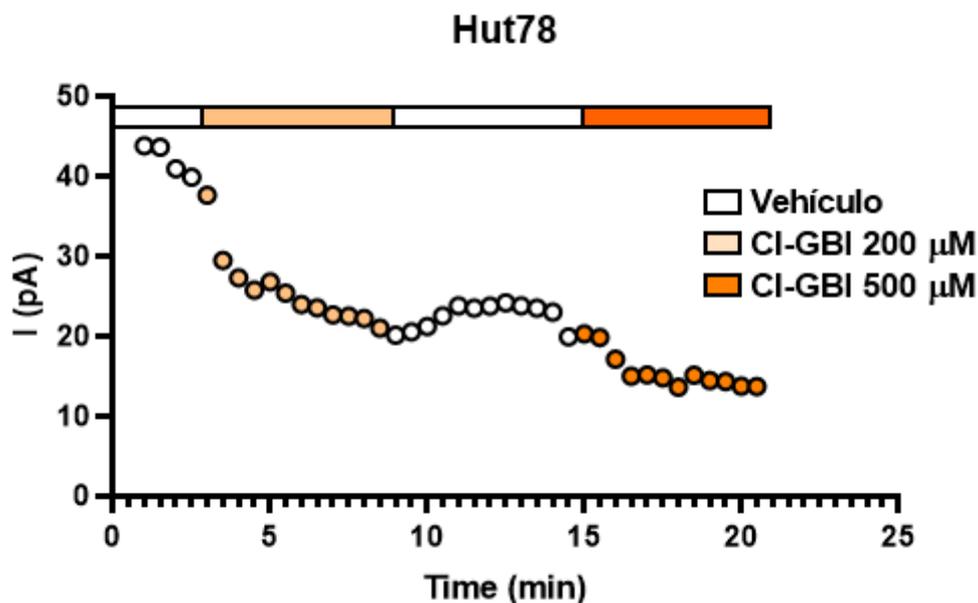


Figura 22: Respuesta de la corriente observada en la línea celular HuT78 ante el agregado de concentraciones crecientes de Cl-GBI, inhibidor del canal Hv1. Se representa la magnitud de la corriente evocada al aplicar pulsos de +40mV en función del tiempo, indicando los intervalos de tiempo durante los cuales se administró Cl-GBI o vehículo en la solución extracelular.

Una vez establecida la identidad de las corrientes observadas en las células HuT78 como corrientes mediadas por el canal Hv1, decidimos evaluar nuevamente la funcionalidad de este canal en la línea celular Karpas299, bajo condiciones aún más favorables para el registro de corrientes mediadas por el mismo. Para ello, utilizamos una solución extracelular ajustada a un pH 7,8 y una solución intracelular con un pH 5,5 (estableciéndose así un ΔpH intermembrana = 2,3). Además, en algunos de los ensayos añadimos ATP en concentración 5 mM a la solución intracelular, ya que el mismo actúa como un estimulante de la actividad del canal⁵⁵. Los resultados obtenidos se grafican en la **Figura 23**; no se observan corrientes mediadas por el canal Hv1 en ninguna de las condiciones ensayadas.

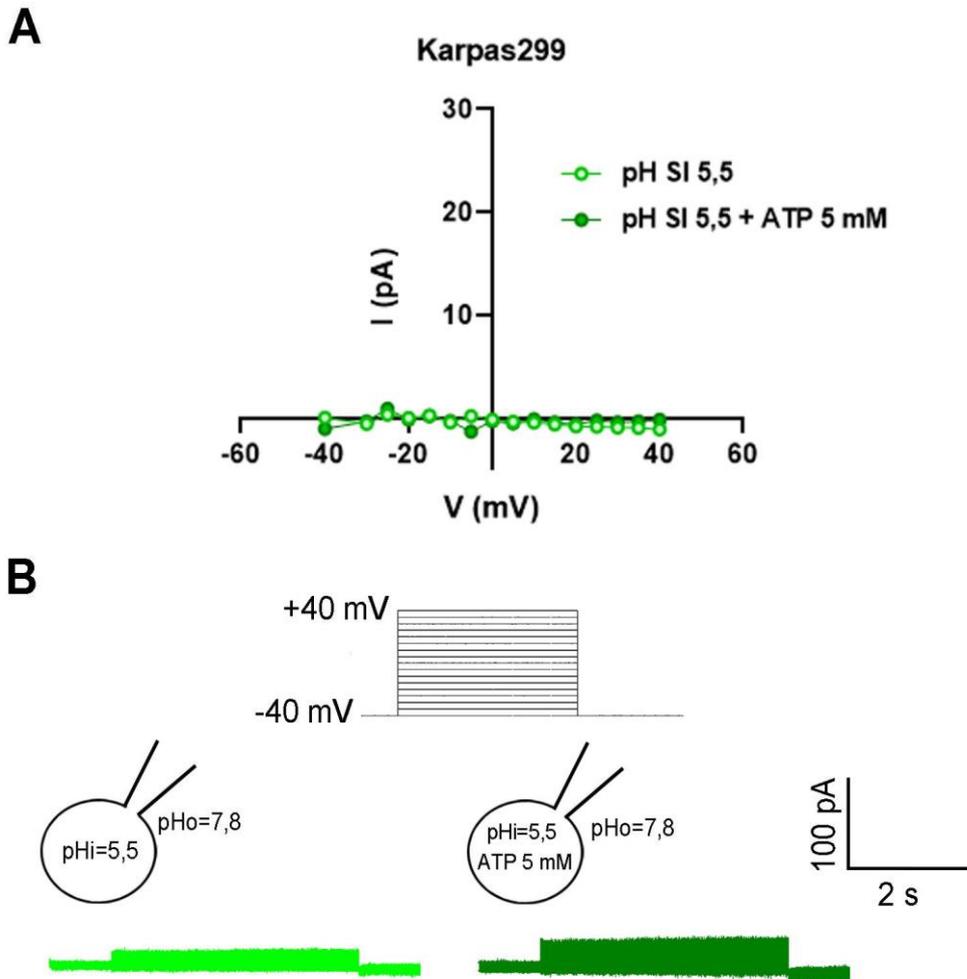


Figura 23: Registro de las corrientes evocadas por células Karpas299 en condiciones estimulantes de la actividad del canal Hv1. La corriente mediada por el canal Hv1 fue determinada mediante la técnica de Patch-Clamp, en la configuración de célula entera, con un gradiente de 2,3 unidades de pH a través de la membrana celular. Se muestra la media \pm SEM de los valores de corriente en función del voltaje aplicado (curva I-V) al utilizar una SI de pH 5,5 ($n = 2$) o una SI de pH 5,5 a la que se adicionó ATP 5 mM ($n = 1$).

4.1.2. Evaluación de los niveles transcripcionales del gen *HVCN1*

Con el objetivo de estudiar si las diferencias observadas en la funcionalidad del canal se deben a una diferencia en su expresión, decidimos evaluar los niveles transcripcionales del gen *HVCN1* en nuestro modelo de estudio. En ambas líneas celulares se observó expresión del ARN mensajero para el canal Hv1. Con el objetivo de comparar los niveles de expresión entre ambas líneas, los resultados fueron normalizados a los valores obtenidos en la línea celular Karpas299, a la cual se le asignó el valor de 1. Como se muestra en la **Figura 24**, se observó una tendencia indicando que las células HuT78 presentan mayores niveles de mRNA correspondientes al gen *HVCN1* respecto a las Karpas299, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

Expresión basal

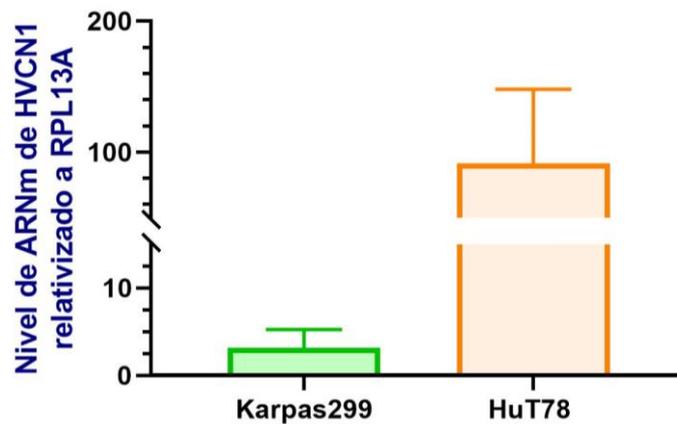


Figura 24: Niveles transcripcionales basales del gen *HVCN1* en ambas líneas celulares determinados mediante la técnica de RT-qPCR. Los resultados fueron normalizados respecto al promedio de los valores obtenidos en la línea celular Karpas299, al cual se le asignó el valor de 1. El gráfico muestra la media +/- SEM (error estándar de la media) en ambas líneas celulares. Test de Student de dos colas para muestras no apareadas.

4.1.3 Evaluación de los niveles proteicos del canal Hv1

En vista de las diferencias observadas en los niveles de ARNm correspondiente al gen *HVCN1* entre ambas líneas celulares, decidimos estudiar los niveles de expresión proteica del canal Hv1 en células Karpas299 y HuT78 mediante la técnica de citometría de flujo, tal como se describe en la sección 3.

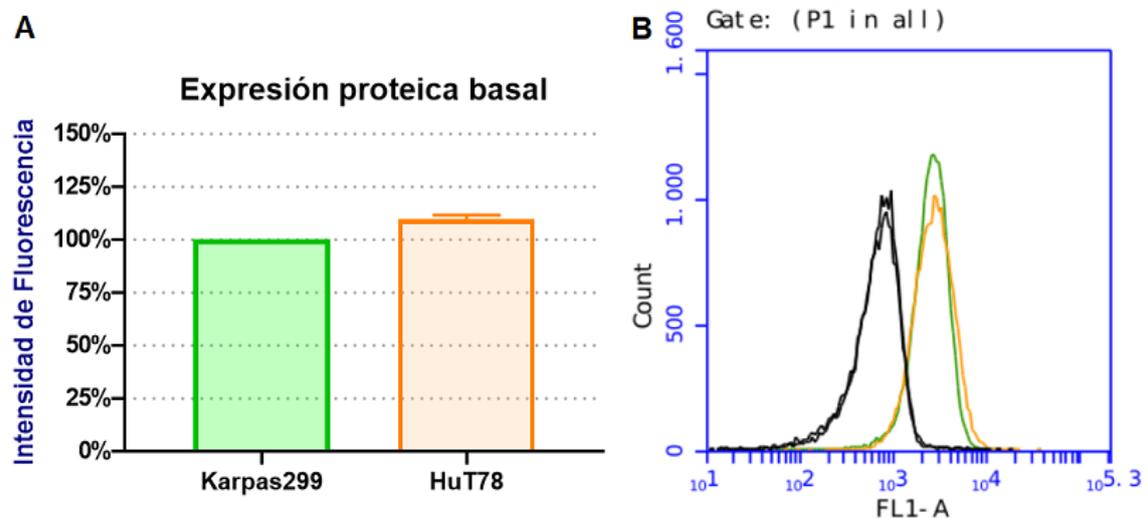


Figura 25: Niveles de expresión proteica basal del canal Hv1 en ambas líneas celulares determinados mediante citometría de flujo con un anticuerpo específico para el canal, reconocido a su vez por un anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo FITC. **A)** Resultados normalizados respecto a la intensidad de fluorescencia media de la línea celular Karpas299, al cual se le asignó un valor arbitrario de 100%. El gráfico muestra la media +/- SEM en la línea HuT78. Test de Student de una muestra respecto a una media teórica de 1 (100%). **B)** Histograma representativo, en el cual los picos a la izquierda (en color negro) corresponden a la autofluorescencia de ambas líneas celulares, mientras que a la derecha aparecen superpuestos los picos correspondientes a Karpas299 (en verde) y HuT78 (en naranja).

Ambas líneas celulares presentaron expresión de la proteína Hv1. Debido a que los replicados ($n = 3$) fueron realizados en distintas ocasiones, y ligeros cambios en el voltaje o ganancia del equipo modifican fuertemente las medidas realizadas, observamos una gran variabilidad en las medias de fluorescencia de distintas fechas para una misma línea celular. Para salvar este

inconveniente, en cada fecha las intensidades de fluorescencia medidas fueron normalizadas a los valores medidos para la línea celular Karpas299, a la cual se le asignó el valor de 100%. Como se muestra en la **Figura 25**, si bien las células de la línea HuT78 registraron una intensidad de fluorescencia un 10% mayor a la de Karpas299, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

4.2 Efecto de concentraciones fisiológicas de HTs sobre la expresión y actividad del canal Hv1

4.2.1 Análisis bioinformático

Como describimos anteriormente, en este trabajo utilizamos la base de datos JASPAR para identificar posibles sitios de interacción de los TRs con las secuencias promotoras del canal Hv1. Los resultados indicaron que existen tres sitios probables de unión a TRs con un puntaje relativo superior a 0,825. Las secuencias de los sitios hallados se muestran en la **Tabla 4** y en el **Anexo I**.

Sitio predicho	Matriz	Score relativo	Posición	Hebra	Secuencia
Sitio I	MA1969.2	0,846	232-249	+	CTGACCTCAAGTGATCCG
Sitio II	MA1575.2	0,839	1673-1689	-	TATCCTGAATCCGGCCA
	MA1575.2	0,835	1673-1689	+	TGGCCGGATTCAGGATA
Sitio III	MA1575.2	0,849	3966-3982	-	CAACCCCAAGGAGGTGA
	MA1575.2	0,847	3966-3982	+	TCACCTCCTGGGGTTG

Tabla 4: Sitios de unión predichos para TR α/β en la región promotora del gen *HVCN1*. En amarillo se resaltan los sitios correspondientes a un arreglo DR4 y en verde los correspondientes a un arreglo IP6, descritos en la **sección 1.2.2**.

Este tipo de análisis tiene una alta sensibilidad (en la gran mayoría de los casos se detectan los sitios que *in vivo* son activos) pero una muy baja selectividad (muchos de los sitios detectados por este análisis no tienen funcionalidad *in vivo*). Por ello es que procedemos a realizar experiencias de laboratorio, para observar si el tratamiento con HTs *in vitro* produce algún efecto en la expresión o función del canal en las líneas celulares con las que trabajamos.

4.2.2 Evaluación de los niveles transcripcionales del gen *HVCN1* en células tratadas con concentraciones fisiológicas de HTs

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos mediante análisis bioinformáticos, decidimos estudiar los niveles transcripcionales del canal Hv1 en ambas líneas celulares en presencia de HTs o vehículo. Para ello, se realizaron tratamientos de 6 horas de duración con concentraciones fisiológicas de HTs (tal como se describe en la **sección 3.1**), luego de los cuales se evaluaron los niveles transcripcionales del gen *HVCN1* en comparación con los controles a los que se les administró vehículo, mediante la técnica de RT-qPCR. Para el tratamiento estadístico se relativizó el valor obtenido en cada muestra tratada con HTs respecto al valor obtenido en su

correspondiente muestra control (tratada con vehículo), asignándole a esta última un valor arbitrario de 1.

Los resultados correspondientes a la línea Karpas299 se exponen en la **Figura 26**. Como puede observarse, el tratamiento con HTs produjo un aumento de los niveles de ARNm del gen *HVCN1*, registrando en promedio un valor correspondiente a 5 veces el nivel observado en la condición control, sin alcanzar significancia estadística (p valor = 0,0594; n = 5).

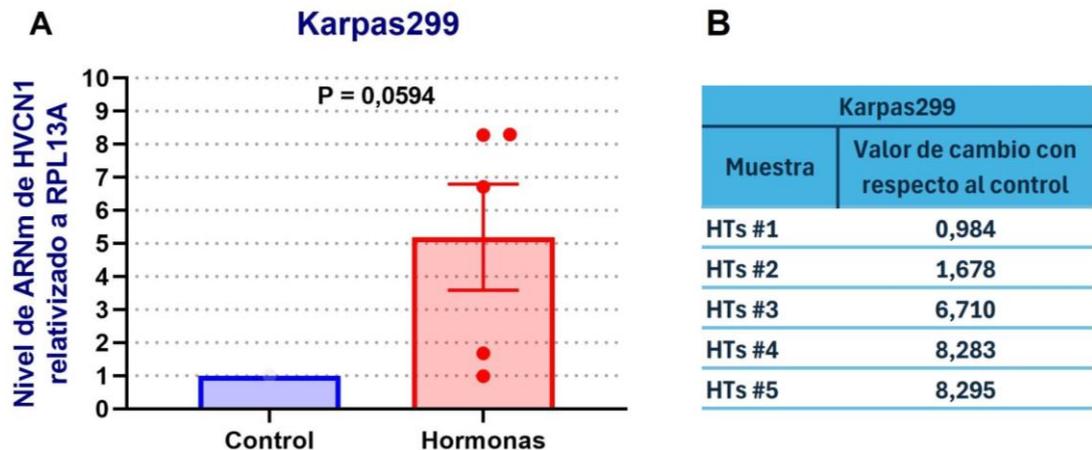


Figura 26: Efecto de las HTs sobre los niveles transcripcionales del gen *HVCN1* en células Karpas299. **A)** Media +/- SEM del valor de cambio (*fold*) en células tratadas durante 6 h con concentraciones fisiológicas de HTs respecto a las tratadas con vehículo, a las que se les asignó el valor de 1. Test de Student de una muestra respecto a una media teórica de 1. **B)** Valores de *fold change* obtenidos en los 5 replicados.

Sin embargo, cabe destacar que tan solo uno de los replicados (denominado como HTs #1 en la **Figura 26B**, con un *fold change* de 0,984) presentó niveles constantes de expresión del ARNm para el canal entre la muestra vehículo y la muestra tratada con HTs, mientras que todos los demás replicados mostraron un aumento de la expresión en la muestra tratada respecto al vehículo. Por ello, podemos aducir que es posible que el tratamiento con HTs realizado en la muestra #1 no haya sido exitoso (debido a algún problema en la preparación o almacenamiento de las diluciones de hormonas, o por un error experimental al no haber agregado las hormonas al pocillo correspondiente).

En cuanto a la línea celular HuT78, también se halló un incremento en los niveles transcripcionales del canal de las células tratadas con HTs con respecto al grupo control. Los resultados se exponen en la **Figura 27**, donde se observa que las muestras tratadas con HTs presentaron en promedio un nivel de expresión de ARNm para *HVCN1* correspondiente a 1,6 veces el nivel de la condición control, alcanzando significancia estadística (p valor = 0,0161; n = 5).

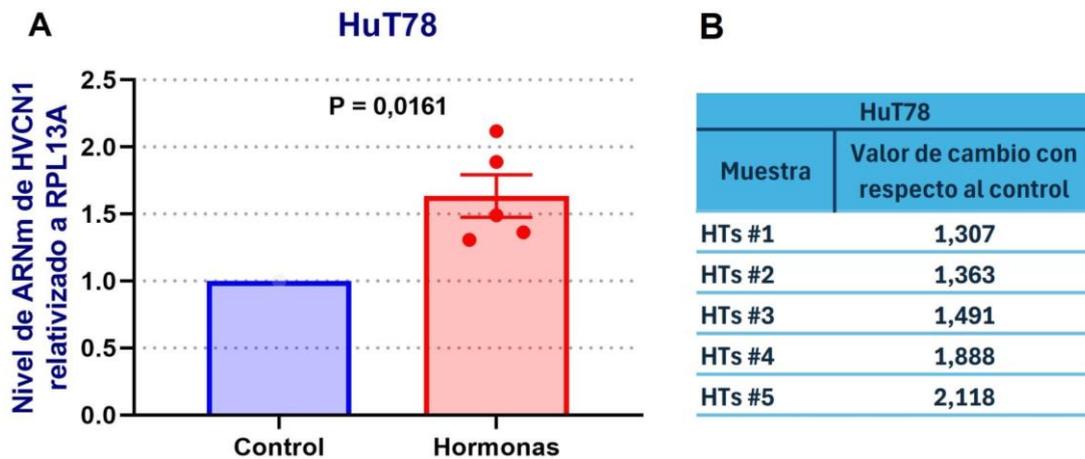


Figura 27: Efecto de las HTs sobre los niveles transcripcionales del gen *HVCN1* en células HuT78. **A)** Media +/- SEM del valor de cambio (*fold*) en células tratadas durante 6 h con concentraciones fisiológicas de HTs respecto a las tratadas con vehículo, a las que se les asignó el valor de 1. Test de Student de una muestra respecto a una media teórica de 1. **B)** Valores de *fold change* obtenidos en los 5 replicados.

En resumen, el tratamiento con concentraciones fisiológicas de HTs resultó en un aumento significativo o una tendencia ascendente en los niveles transcripcionales correspondientes al gen *HVCN1* en ambas líneas celulares.

4.2.3 Evaluación de los niveles proteicos del canal Hv1 en células tratadas con concentraciones fisiológicas de HTs

Habiendo establecido que el tratamiento con HTs resultó en un incremento de los niveles transcripcionales del gen, procedimos a analizar la expresión a nivel proteína del canal Hv1 mediante la técnica de citometría de flujo, tal como se describe en la **sección 3.2**. Inicialmente decidimos estudiar los cambios en la expresión proteica del canal Hv1 en ambas líneas celulares luego de someterlas a tratamientos con hormonas durante 24 y 48 horas (que posteriormente agrupamos, denominándolos tratamientos a tiempos largos).

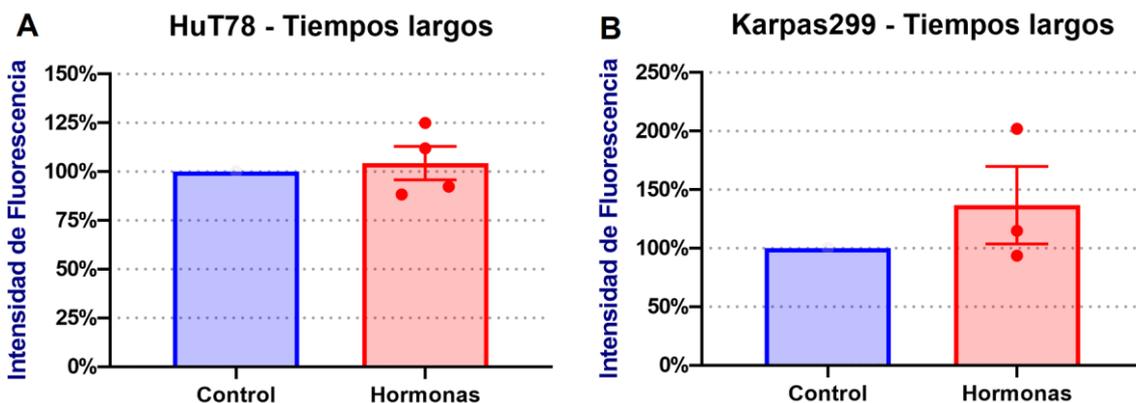


Figura 28: Efecto del tratamiento con HTs a tiempos largos (24 y 48 horas) sobre los niveles proteicos del canal Hv1 en las líneas celulares **A)** HuT78 y **B)** Karpas299. Los niveles de proteína fueron determinados mediante citometría de flujo con un anticuerpo específico para el canal, reconocido a su vez por un anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo FITC. El gráfico muestra la media +/- SEM de la intensidad de fluorescencia en células tratadas con niveles fisiológicos de HTs respecto a las tratadas con vehículo, a las que se asignó un valor arbitrario de 100%. Test de Student de una muestra respecto a una media teórica de 1 (100%).

Los resultados de los tratamientos para ambas líneas se muestran en la **Figura 28**. Para el tratamiento estadístico se relativizó la media de intensidad de fluorescencia en cada muestra

tratada con HTs respecto al valor obtenido en su correspondiente muestra control (tratada con vehículo), asignándole a esta última un valor arbitrario de 100%. Como puede observarse, no existen diferencias significativas en los niveles de proteína Hv1 entre las muestras tratadas con HTs y las expuestas únicamente al vehículo.

Dado que no encontramos diferencias en la expresión proteica del canal Hv1 después de los tratamientos con concentraciones fisiológicas de HTs a tiempos prolongados (24 y 48 horas) y teniendo en cuenta que anteriormente observamos un incremento en los niveles transcripcionales del canal tras un tratamiento de 6 horas con HTs, optamos por evaluar los niveles proteicos luego de realizar tratamientos menos prolongados. Sobre la línea celular HuT78 realizamos tratamientos con duraciones de 3 y 6 horas (que posteriormente agrupamos, denominándolos tratamientos a tiempos cortos); mientras que, por limitaciones en la cantidad de anticuerpo primario disponible, pudimos realizar una única réplica de un tratamiento de 6 horas sobre células de la línea Karpas299. Los resultados se exponen en la **Figura 29**.

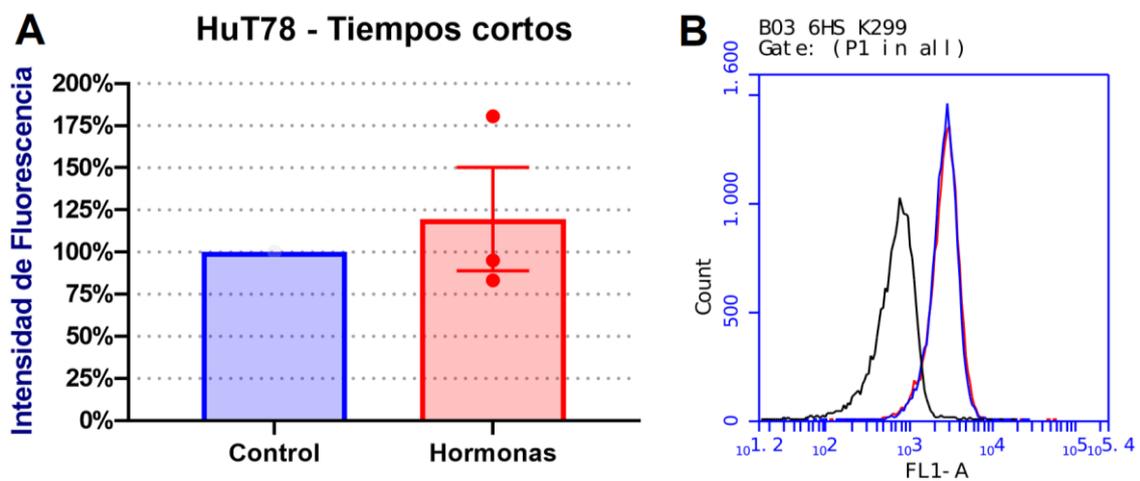


Figura 29: Efecto del tratamiento con HTs a tiempos cortos (3 y 6 horas) sobre los niveles proteicos del canal Hv1. Los niveles de proteína fueron determinados mediante citometría de flujo con un anticuerpo específico para el canal, reconocido a su vez por un anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo FITC. **(A)** Media \pm SEM de la intensidad de fluorescencia en células HuT78 tratadas con niveles fisiológicos de HTs respecto a las tratadas con vehículo, a las que se asignó un valor arbitrario de 100%. Test de Student de una muestra respecto a una media teórica de 1 (100%). **(B)** Histograma de intensidad de fluorescencia del único tratamiento con HTs realizado a tiempos cortos en células Karpas299. El pico a la izquierda (color negro) corresponde a la autofluorescencia, mientras que a la derecha aparecen superpuestos los picos correspondientes al tratamiento con HTs (en rojo) y con vehículo (en azul), evidenciando que no hay diferencias entre ambos grupos experimentales.

En síntesis, los tratamientos con concentraciones fisiológicas de HTs no produjeron cambios en los niveles de proteína Hv1, en ninguna de las duraciones ensayadas.

4.2.4 Evaluación funcional del canal Hv1 en células tratadas con concentraciones fisiológicas de HTs

Finalmente, evaluamos los efectos producidos por las HTs en la función del canal Hv1. Para ello, las células fueron tratadas con concentraciones fisiológicas de HTs o vehículo durante 48 horas y, posteriormente, se registró la corriente mediada por el canal mediante la técnica de Patch-Clamp. Como puede observarse, el tratamiento con HTs no modificó significativamente la corriente a ninguno de los voltajes evaluados. Estos resultados concuerdan con los obtenidos mediante citometría de flujo al evaluar los efectos de las HTs sobre la expresión proteica del canal.

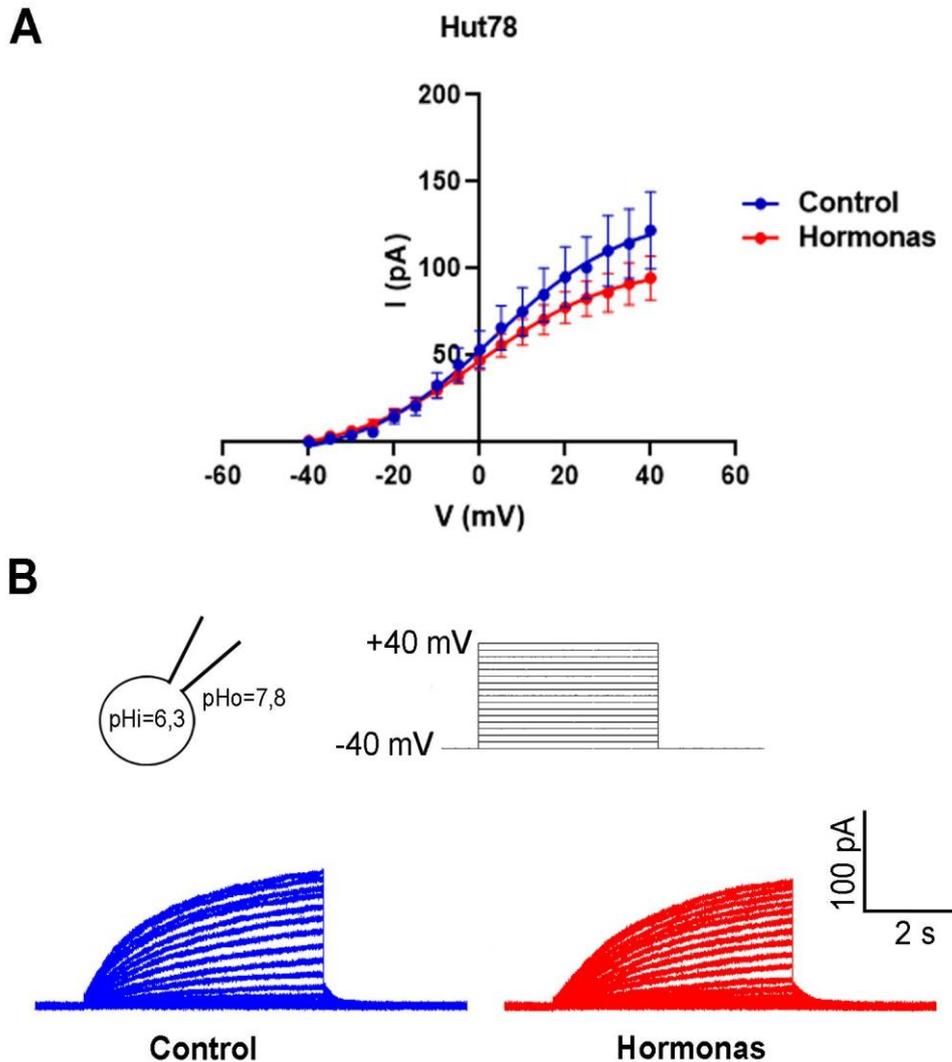


Figura 30. Efecto del tratamiento con HTs durante 48 horas sobre la funcionalidad del canal Hv1 en células HuT78. La corriente mediada por el canal Hv1 fue determinada mediante la técnica de Patch-Clamp, en la configuración de célula entera, con un gradiente de 1,5 unidades de pH a través de la membrana celular. **A)** Se muestra la media \pm SEM de los valores de corriente en función del voltaje aplicado (curva I-V) en células Hut78 cultivadas en presencia de HTs ($n = 12$) o vehículo (control, $n = 15$). Para el análisis estadístico, se realizó un test de Student de dos colas para muestras no pareadas a cada valor de voltaje analizado. **B)** Esquema representando la configuración y las concentraciones de H^+ utilizadas en la técnica de Patch-Clamp, el protocolo de voltaje aplicado, y corrientes representativas obtenidas en células HuT78 en ambas condiciones experimentales.

Estos ensayos fueron también realizados en células Karpas299, con el fin de evaluar si el tratamiento con HTs inducía la expresión del canal Hv1 en la membrana celular, permitiendo así el registro de corrientes evocadas por el mismo mediante la técnica de Patch-Clamp. Como puede observarse en la **Figura 31**, no observamos corrientes de H^+ en las células Karpas299 en ninguna de las condiciones ensayadas.

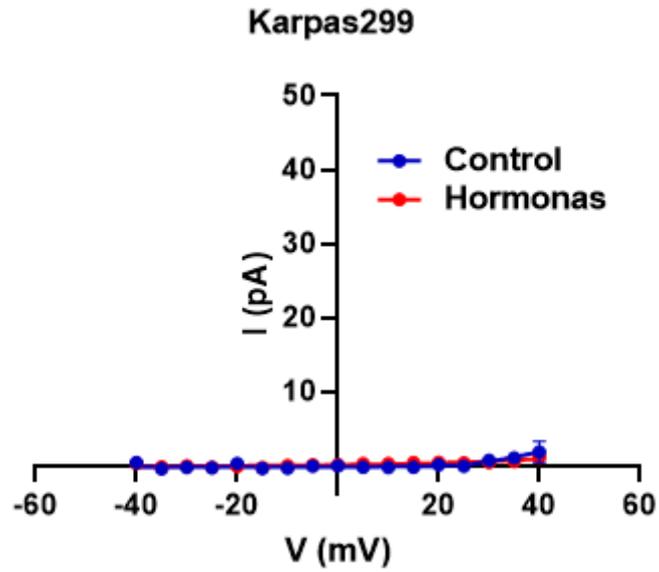


Figura 31. Efecto del tratamiento con HTs durante 48 horas sobre la funcionalidad del canal Hv1 en células Karpas299. La corriente mediada por el canal Hv1 fue determinada mediante la técnica de Patch-Clamp, en la configuración de célula entera, con un gradiente de 1,5 unidades de pH a través de la membrana celular. Se muestra la media +/- SEM de los valores de corriente en función del voltaje aplicado (curva I-V) en células Karpas299 cultivadas en presencia de HTs (n = 6) o vehículo (control, n = 4). Para el análisis estadístico, se realizó un test de Student de dos colas para muestras no pareadas a cada valor de voltaje analizado.

5. DISCUSIÓN

Comenzamos este trabajo caracterizando la actividad del canal Hv1 en dos líneas celulares derivadas de PTCLs (HuT78 y Karpas299), motivándonos por reportes previos que indican que la corriente mediada por este canal se encuentra aumentada en la línea celular Jurkat (correspondiente a linfocitos T tumorales), en relación a la corriente observada en linfocitos T normales⁵⁶. Llamativamente, utilizando la técnica de Patch-Clamp observamos una ausencia de corriente mediada por el canal Hv1 en la línea celular Karpas299, mientras que las células HuT78 presentaron corrientes salientes de H⁺, dependientes del voltaje y del pH e inhibibles por Cl-GBI, compatibles con corrientes mediadas por el canal Hv1. Esta importante diferencia entre ambas líneas celulares, que no ha sido reportada hasta el momento en literatura, nos llevó a cuestionarnos si la falta de corriente en las células Karpas299 se debía a una ausencia de la expresión del gen *HVCN1*.

Para evaluar esta hipótesis, decidimos caracterizar la expresión del canal Hv1 a nivel transcripcional y proteico tanto en Karpas299 como en HuT78. Los resultados obtenidos demuestran la presencia de ARN mensajero y proteína correspondiente al canal Hv1, en ambas líneas celulares. En concordancia con los resultados obtenidos mediante la técnica de Patch-Clamp, observamos mayores niveles transcripcionales para el gen *HVCN1* en las células HuT78 en comparación con las células Karpas299; sin embargo, esta diferencia no se observó al evaluar los niveles proteicos del canal.

Debido a que los análisis bioinformáticos realizados sobre las regiones promotoras del gen *HVCN1* nos permitieron identificar 3 posibles sitios de unión para los receptores nucleares de HTs, decidimos evaluar los efectos producidos por concentraciones fisiológicas de estas hormonas sobre la expresión del canal Hv1 en ambas líneas celulares, y sobre las corrientes mediadas por el mismo en nuestro modelo de estudio. En este sentido, encontramos que las HTs producen un aumento en la expresión transcripcional del gen *HVCN1* en ambas líneas celulares, pero este aumento no se ve reflejado en los niveles de proteína ni en la corriente mediada por el canal. A continuación, se discutirán con más detalle distintos aspectos de este trabajo.

5.1 Diferencias en la expresión y actividad del canal Hv1 entre ambas líneas celulares

Tal como se describe en la sección anterior, a partir de los ensayos de RT-qPCR realizados, detectamos una diferencia en los niveles transcripcionales del gen *HVCN1* entre las líneas celulares HuT78 y Karpas299, siendo que los niveles de ARN mensajero en la primera tienden a ser más altos que en la segunda. Este resultado concuerda con reportes de RNA-Seq⁵⁷ publicados en bases de datos de acceso público (disponibles en cBioPortal Database <https://www.cbioportal.org/>), según los cuales la línea celular HuT78 presenta una expresión 8 veces mayor que la línea celular Karpas299. Sin embargo, no detectamos diferencias en los niveles proteicos de expresión del canal Hv1 entre las dos líneas celulares utilizando la técnica de citometría de flujo. Por su parte, cuando utilizamos la técnica de Patch-Clamp para estudiar la actividad del canal Hv1 situado en membrana plasmática, encontramos corriente mediada por el mismo sólo en las células de la línea HuT78, mientras que las células Karpas299 no evocaron corrientes pese a nuestros intentos de forzar al sistema hacia su estado conductivo (mediante un aumento del gradiente de pH a través de la membrana y un agregado de ATP, inductor de la actividad del canal Hv1, a la solución intracelular).

Debido a que en Karpas299 hemos hallado expresión tanto a nivel transcripcional como proteico del canal Hv1, resulta interesante discutir las posibles razones de la ausencia de corrientes de H⁺ observada en los experimentos de Patch-Clamp en esta línea celular. Una posible explicación es que el canal se encuentre localizado en membranas intracelulares en esta línea celular. Debido a que la técnica de Patch-Clamp en la configuración de célula entera permite el estudio de canales iónicos situados en la membrana plasmática, no resultaría posible entonces evidenciar su actividad mediante esta metodología. Cabe mencionar que en un ensayo preliminar de inmunofluorescencia que realizamos en la línea celular Karpas299, se detecta marca fluorescente alejada de la membrana plasmática, pudiendo corresponder a una localización del canal en membranas intracelulares (sin descartar que puede tratarse de proteínas que se encuentran transitando el proceso de localización hacia la membrana plasmática). Apoyando esta línea, existen algunos reportes de localización del canal Hv1 en membrana mitocondrial de linfocitos CD8+, tal como se menciona en la **sección 1.3**; aunque hasta el momento esto no se ha reportado en células CD4, que son las utilizadas en esta tesis²⁸.

Otra hipótesis posible es que las células Karpas299 expresen una isoforma no conductora del canal. En este sentido, el canal Hv1 presenta homología con la estructura del dominio sensor de voltaje de otros canales iónicos voltaje operados, como los canales Kv⁵⁸, y también con el dominio sensor de voltaje presente en una proteína fosfatasa, que regula la actividad enzimática de la misma⁵⁹. Por ello, el canal Hv1 en estas células podría estar actuando como un sensor de voltaje y/o pH, transduciendo la señal a otras estructuras de la membrana celular que actuarán como efectoras.

5.2 Regulación del canal Hv1 por parte de las HTs

En las líneas celulares Karpas299 y HuT78, el tratamiento con concentraciones fisiológicas de HTs tuvo como consecuencia un aumento en los niveles de ARNm del gen *HVCN1*, constituyendo este estudio el primer informe sobre la regulación transcripcional del canal Hv1 mediada por estas hormonas. Este resultado, junto con nuestro hallazgo mediante un análisis bioinformático de tres posibles sitios de unión para receptores nucleares de HTs en el promotor del gen *HVCN1*, nos lleva a postular que el aumento transcripcional observado podría deberse a una acción de las hormonas mediante su mecanismo clásico, mediado por los TRs.

Sin embargo, como el aumento a nivel transcripcional luego del tratamiento con HTs no se vio reflejado en un aumento de la expresión protéica del canal en ninguna de las dos líneas celulares, ni se tradujo en una modificación de la actividad funcional del canal Hv1 en la línea HuT78, es posible postular la existencia de mecanismos postranscripcionales o postraduccionales que regulen la expresión del canal Hv1.

5.3 Problemas de reproducibilidad observados

En la comparación de los niveles basales de ARN mensajero del gen *HVCN1*, realizada mediante la técnica de RT-qPCR, nuestro resultado experimental sugiere que los promedios de expresión para ambas líneas difieren considerablemente, en el mismo sentido que indican reportes previos de RNA-Seq⁵⁷ (disponibles en cBioPortal Database <https://www.cbioportal.org/>), según los cuales la línea celular HuT78 presenta una expresión 8 veces mayor que la línea celular Karpas299. Sin embargo, no fuimos capaces de validar esta diferencia estadísticamente con nuestros resultados experimentales debido a que se observó una gran variabilidad intragrupo en los niveles observados para cada línea celular. Esto puede deberse, en parte, a la diversidad

existente entre las muestras celulares utilizadas (descongeladas de distintos viales y cultivadas en distintas fechas).

Además, cabe destacar que durante el período de tiempo en el que se realizó la sección experimental de este trabajo ocurrió una contaminación por micoplasma en el cuarto de cultivo de líneas celulares, que se mantuvo durante varios meses. Se ha reportado que líneas celulares infectadas con micoplasma sufren cambios en su metabolismo, por lo que este factor podría ser responsable, al menos en parte, de la variabilidad observada⁶⁰.

5.4 Perspectivas a futuro de la línea de investigación

Para obtener una mejor comprensión de la función del canal Hv1 en las líneas celulares Karpas299 y HuT78, derivadas de LCTs, nos proponemos realizar una serie de ensayos a futuro. En primer lugar, realizaremos estudios de inmunofluorescencia para observar la distribución subcelular del canal Hv1 y detectar posibles diferencias en la ubicación del mismo entre las dos líneas celulares. Actualmente disponemos de resultados preliminares que sugieren una localización del canal en membranas intracelulares en células de la línea Karpas299. Otra posibilidad sería realizar una secuenciación del ARN mensajero del canal Hv1 en las líneas celulares estudiadas, de modo de revelar posibles variantes de splicing alternativo (que podrían codificar para diferentes isoformas del canal, incapaces de conducir corriente) e identificar secuencias de localización (que podrían confirmar la ubicación del canal en membranas de organelas intracelulares).

Con el objetivo de dilucidar los mecanismos de regulación mediados por HTs, nos proponemos en primer lugar completar los estudios de citometría de flujo en la línea celular Karpas299, para evaluar con más precisión si existe una regulación de los niveles de expresión del canal Hv1 a nivel proteico. Para profundizar en el estudio de la regulación transcripcional, nos proponemos dos posibles experimentos para evaluar si la regulación al alza está efectivamente mediada por los receptores nucleares de HTs. Por un lado, podríamos realizar un silenciamiento de los genes codificantes para TRs mediante interferencia por ARN (contamos actualmente en el laboratorio con siRNA contra el gen *THRA*) y observar si los tratamientos con HTs siguen produciendo un aumento de los niveles de ARNm para el gen *HVCN1* o si, por el contrario, el efecto regulatorio de las HTs deja de observarse. Otra opción es realizar en nuestras líneas celulares de trabajo una inmunoprecipitación de cromatina (ChiP) utilizando anticuerpos específicos para TRs, y de este modo determinar si existe una interacción entre estos factores de transcripción y la región promotora del gen *HVCN1*.

6. CONCLUSIONES

Pudimos detectar en ambas líneas celulares expresión del canal Hv1, tanto a nivel de ARN mensajero como a nivel de proteína. Mediante la técnica de Patch-Clamp, fuimos capaces de medir en la línea celular HuT78 corrientes de H⁺ compatibles con las corrientes mediadas por este canal iónico: tienen una magnitud y una cinética de activación coincidentes con las reportadas previamente en bibliografía, su probabilidad de apertura presenta una dependencia con el gradiente de pH establecido entre ambos lados de la membrana, y fueron inhibidas por Cl-GBI. No pudimos detectar actividad del canal Hv1 en la línea celular Karpas299, postulando como posibles causas la localización del canal por fuera de la membrana plasmática o la existencia de una isoforma no conductiva del canal.

En cuanto a la relación entre las HTs y el canal, identificamos mediante un análisis bioinformático tres sitios probables de unión a TRs en la región promotora del gen HVCN1 (factores de transcripción activados por HTs). Posteriormente, comprobamos que el tratamiento *in vitro* con concentraciones fisiológicas de HTs incrementa los niveles de ARNm para este gen, siendo este trabajo el primer reporte de regulación transcripcional del canal Hv1. Pese al aumento de la expresión transcripcional, no detectamos que el tratamiento con HTs produzca un aumento a nivel proteína del canal Hv1. En HuT78, la línea en la que pudimos aplicar exitosamente la técnica de Patch-Clamp, tampoco observamos que el tratamiento produjera diferencias en las propiedades de las corrientes medidas.

7. ANEXOS

Anexo I: Regiones promotoras del gen *HVCN1* y sitios de unión predichos para TRs.

Se muestran las secuencias de las regiones del gen *HVCN1* etiquetadas como promotoras, y sobre ellas se resaltan los sitios de unión predichos para TR α / β . En amarillo se muestra el sitio correspondientes a un arreglo DR4 y en verde los correspondientes a un arreglo IP6, descritos previamente en la **sección 1.2.2**.

```
>RegProm1 dna:chromosome chromosome:GRCh38:12:110686000:110690201:1
AATTTTTTTTTTCCCCTGAGACAGAGTCTCGTTCTGTTGCC TAGGCTGGAATGCAGTGGTATGATCTCGG
CTCACTGCAACCTCTGTCTCCCAGGTTCAAGCGATTCTCCTGCTTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGATTAT
AAGTGCCCACCACCACGCCAGCTAAAAATTTTTTTTTGTATTTTTAGTAGAGACGGGGTTTTGCCACGTT
AGCCAGGCTGGTCTCAGACTC CTGACCTCAAGTGATCCG TTGCCCTCAGCCTCCTAAAGTGCTGGAATTAC
AGGCATGAGCCACCGTGCCCTAATTC TAAAAAAT TATTTT GAAATAAACTTTCAAGAAAAC TTTAA
AGAGGTTCTTTCTCTCCCCACAGTTACATGCTGAGGGTGCAAGGGACTCTTAGACTTTCTCGCTGGTTGA
CTGGCAGAGCAACTTCTGGACCCAGCAGAGTTCAGCTTTGCATGTCCCTATACCAGCCCCCTGGGATTCT
CAACCTGCTCTCAGAGAGGGGCTCAAGTGGAACCATCACCACAAGAGGAGGTGAAGGGAAAAATTAAGG
TGCCCTGGAGATTTCTACCTTTGCAAGACAGGAGCTAGAACTAGCACACACGCAGAGGAACACTCAGCT
TCAGCAATTCAAGCAACAGAAACTTTAAAACTACCATGCCCTTCTCCAT TAAACTAGCCAAAACAAATAA
AAAGGATAAAAAACCAATGCTTGCAGAGCTGCAGAGAAATGTGCACACATTCCTGGGGATGATTTTTCTAA
ATAGCTACCTGGTCACAAGAGGTAAGTGCTTCCAAAATGATCCACCCTTGACTTGCACACCTTGGTTAG
GAAACTGTATCTCCAAGAAGCCATTTGATAGCCAAAAACATGCACAATATGGACAATGATATTTATAGCT
AAGTTGAATAGTATGGCTAAAACCTGGAAGTGCCCTCAACCCCAAGCCCTACTTTAGGGAAAAGCTGA
GGAAGGCAGTGGGCTCTTGGGAGGGATAATCTGAAGTCTATGTAGAAACGGGAGAAAAAATGCTGTCAA
GCAGTGAGAAGAAAAATAGGCTGATGGCTGACACATTCCTGCAACTGTACAAAAC TATCTGAGCCATTC
CTAGGTGCCAGGCACTGATTTCCCAGGTTCTGGGAAATCCAAGGTGAAGAGGAAAGGGCAAGATCACGAT
CCTGGTAGACTGACATGTTACCTGGGGAGACAAACAAGGAAGCAAGGAAATATACAAGACAGACCACACC
CCCCCCCCCAGCTAAGCACTGGGAAGCCAGCCAGCCAGAGTAAGGGGCCAGGGAGCAGGCGGGGTCTCC
TTAAGTGGGGTGGTCAGGGACAACCTCGACATTTATGGTGTGCCCTGAATTACAAGGGAGTATGTCACAGA
TTGCAGAGAAGAGCATTTCCGGGAAAAGGAAGAACACGTGTGCTGTGCACAGCCCCTGAGAGAGCGGAGT
ACTTAGGAGGTGGCGGCTGGGGACAGCAGTGGACAGGACAGTGGCCAGAGAGAAAAAT T GAGAATAATCA
CACAGGGCCTGATCATGGAGAGGGCTTGGCAGGCGATGCTGGGGATTTGGATGGAAGTGAGGGGTCCAGC
GTGATGAGGCGGCAAGAGATGCTGGCGGCTGGTCTCAGGGTGGAAGTAGGGGGTGGAGGGG TGGCCGGA
TTTCAGGATA TGCTTTGGGTTAGAACTTGTGCTAGCCTAGACTGTGGGGAAGGGACGAGGAGCGGGGTGG
TGGATGACAGCTCCAGGGCCCAAGCCCCAATGACTAGCAAAGGATCAAGTCTGGGGACAAGAACACTCT
GGCTTTCTCCTTCTTGCTAAACCTGTGTGCGGGAGGGCAGGGGCCACAGAGCAGCTCTGGACCTTGTGCA
AGCCTCAGCCCAGAGATTTTCAAAAACCTGCCCTTATCAGCCTTTCCCTCTGGGGAGTCAGCCAGAGAAG
TTGCCACCCCTCACCTTGGTCTTACTCAAGCAGCTCCTAGTTGCTGGTGGGGCTGTCCGAAATCCTGC
AGATCTCAGATAGCCCTGAACAACCTGAAGTTAAAGGTGCCAGGACAGAGAAGTACTCTCAGAGGGGCA
GGACGGAGGGTGGAGGAAGCACTGGAACCATGAACTTTTGGTAGTAACCTGGTGCCAGGGGCTAAGCCTG
TACACCAAGCATCTTATATCATCTTCTCAGCAATCCTGCGAGGTAGGTACATGCTTAACCTCATGGGACA
GATGCGGAAACTGAGGCAGAGACAGGCCAAGTCACGAAGCTGAGCCTGCAAGATCCCCACACCCAGCAC
TGGTAAAAAGTGGTGGGGGCAATGTTGGAGGGAGTTCCTACTGAGGAACTGCTCTCCCTCTCTGTCTTGGC
GTTTACCCTGGCCCCAATCACTCTTGTTCCTCAGCATCTCTGTCTCCAACAGGTGGGTGCTTTTAAAGTG
TTTCTAGGGAAGAGTTTGTCTCCCGGGGCTCCTCCTT CAGGGATGGCTGGGCTGCTCATTGCAGCCTT
CTCCCGGGACATCCAGCACTGCCTCTGCCCTGCTTCTCTCCTACAATCTCCCGGGAGGGCAGCGGGGCA
GGGACGATGCATCCGAGGACTTAGGGGACACAGACCTGGTTGTGAGTTCTGGCTCTGCCCTCCTTTGGCTG
TGTGACCCAAGGCAAGGGGCTTGGCTCTCTGCGTCTTGGTTTCTTACCTGTTAAGAGGGAGACGACGA
TGGTCACTGTGGCTGCTGCGCGGAGTGTGAAGAACTGAAGGCACCTGGCCCAGGGCGGCGCACCACC
AACTCTCCGGGATCGGGGGGTCACTAGGGCCAGCGTCTCCCGCGTTCCCTTCCCTGGACTCCAGTCCCT
GCCGAGGGGAAGCACTGCCCGCCCGCGGGACACGCCAGAGCCAGGGCAACCGAGGGCTGGGGTCTCT
```

GCTGGGGCTCCACGGCGAGGCCTGGACAGCGGAGATGCGGGGGGGTCCCCCTTCTCGGAAGGATCGG
GCACTGGGGTCTTGTAGAAAGGGCTGCACGCCAAACGGGGTACGCCCCCGCCCGGCCGAGCACTTAC
CCGGCGCCCCACCCGCCCGGGTACCGCTGCGACTGGGAGCCTCAGAGCAGGTCCGGCCCAGCCCGTCC
CGCCCCGTACCGTACCAGGCCCCGCCCGGGGCCCGCCCCGCCCCGTCCCCGCCCCACAGCCCCG
CAGACCCCCAACGGTCGGCGGGCTTCTAGGCCTCGGCCGGGTCTTAGTCCCCTTGTCCCTGCCTGTGGT
CAGTCCACCCGTTTCGTCCCTACCTCCCTCACCCCGGTGCCTCCCGCCCCGAGGGTGGGCCTGTCTGG
GCCTCCCGCAGTTACAAAGTCCCGCCCGTGGGAGCGAATCGCGGATCACAAAAATCCTGCCCGGGCCA
GCCTAAGGGAAGGGTGGGCGGGGAACCACTTCCCTCCCGCGGTGGAGCGGGGCGAATCCACCCCG
CCAACCCCTTTCGGGAGCTTCTGCTCCATCCACCGTCTCCGGGCCACCCCTGCCTCTGGGTCTCCTGA
TTCTTGGCCTCGTCCCCTGCACAGTTTCTGCCATGCAGGGGTGGAGGGTGGGCAGCACGCTCTGACGAA
TGAGCAACCTCTCAGCCCTCAGAACTTCCCTTGGTTCGAGGGCTCTGAGGCTGCTCATGGGATGGTACTGG
CAAGAGGGAGCCTTACC CGTGCAGCCCTGCCTGTCTGGGCCGCTTGTCTCCGGGCCAACTCGTACGG
CCCCGAGGCGCAGGCCAGCTCTGAAGTCCCTCCCTGTGGGCCCTCCAGCACCTGTTACACAGTC
GAATCAGTTCTGTAGCTTCTGTCTTCCCCAGAGACCATTTGTCCAAACATCCTGCAAAGCCGTCTTC
TGCACACCTCTCCCTTCCGGTTGAGTCGGGGCTGTGGGGAGAGGC **TACCTCCTTGGGGTTG** GTTTAGTT
TCCTCATGCCGTGTTAACAGATCACACAAACCTAGTGGCTTAACACAAATGTGTTATCTTACAGCCCT
GGAGGCCAGAAGTCTCAGATGGGTCTACAGGGCCAGAATCAAGGTGTGGGTGGGGCTGTGCCTTCTGGA
GGCGCCAGGGTAGTGTGTTCCCTTGCTTTTCCCGGTGGAGAGGTGCCTGTGATCCTTGGCTGTCTCAATC
CG

>RegProm2 dna:chromosome chromosome:GRCh38:12:110691200:110691601:1
CTACAGGCGCCCGCCACCACGCTCGGTTAAATGTTTTGTATTTTTAGTAGAGACGGGGTTTACCGTGT
AACCAGGATGGTCTCGATCTCCTGACCTCGTGCTCCGTCCCTCCCGCCCTCCCAAAGTGTGGGATTACA
GGCGTGAGCCACCGCTCTGGCCAGAAGGCTTCTTAAAAACATTTTGGTCAGATCTCCTGACTTCTCAG
TCATGTATTATTACAACAGCCCCATGCCAGTTTCTAAGGCATAGTCTGGTCCATTTTCAACTTCAACTTC
CTTATATTTTATTAAAAATCTCCTCCTCCCCAGGGCCAGCTAGACAGAGTGGAGAGGATGTGGGGACT
GCTCCCAACAGCCCTCCTCTGTGTTCACTCCCTCTGGTTGAGGAAGGGAA

>RegProm3 dna:chromosome chromosome:GRCh38:12:110693800:110694001:1
GATGCATTCGTTCTGTTTTATGCATTGAAAAACATTACTCTTGAAGAGGTCCAGAAGCTTCCCCAGATG
TCAAAGGCCCCAGATTACAAAAAGATTAGGAACTGCGTTAGATGAAGGACTTGTTCGGTTTGGGCAATA
CCAAAGCAGTTCTCTTACACAAGGCAGTCCCTGCCCCACCCCGGTCCCTCCGCATTTCTTAC

>RegProm4 dna:chromosome chromosome:GRCh38:12:110698200:110698801:1
ATGTTGCCAGGCTGGTCTTGAACCTTAGCTTCAAGCGATCCCTCCCGTCTTGGCCTCCTAAAGTGTGG
GATTACAGGCGTGAGCCTCTATGCCAGCCTTTCCTGTCTGTTGAAGTCGGTGAGACTTAACATTGGGAA
GATGGAGGCAGAAGACACTAGAAAATATGCTCTAACTCACTTTAGTGAGCAGAGCCTTACACTCAAGGGTT
TAGCAGCATCTCCTTGTTCACCTGCTGGTTGCTAGTGGAAAGTGTCTTCCACACCTCGGTTCCGCCCTC
CAGGCCAACTAGAGGCTTCCGCAGCCGCTGCAGCACTGGAGCAGAGCCGAGGTGGGAGGACTCCTGGCTT
CTCCACCACCGAGTCTACATTGAACTCCCTCGCACCCCTTGCAGTTACCTGTTGCAGCAGAGGTCATGT
GATCATCAAATGCTCTGGCCAGGGGGACCCGAGCACTGTCTGCAGGACTTCCAGGAGTTTCTCCTCCT
GCGTCTCCTTCTTGGACAAGGCCAGTGCTGAGTCACTCCGTCCACTGGCCCTGGGCAGCCCCCGCTT
CCCTCCTTCCGTTTTTTGAGAGGAGTGGACCTGTTTACTCATT

>RegProm5 dna:chromosome chromosome:GRCh38:12:110619600:110620000:1
CAAAGCACTAACAGAACTTTC AAGCGAGTCAGATCATTAGCCACTTTGGGGAAACCTCTGATTGTGGGA
TGCTCAAACCTGACTCATTTCCACTTCACAAATTTCCCCCAAAGTGCAATAGGAAAAATAAAATGGATCTT
TTTTATGAAATTGACTTATGGTACACTGTGGTGGCAGGGGCAGTACCACCTGCTGATGGTGATGTTCT
GGATCCTACCCCTCTTTTTTCTGCAGTTGCTGTTCTCTGTGCTGTGACTTATCCCCAGCACAGTGTGAC
ATCAACTGCTGCTGTGATCCCGACTGCAGCTCCGTGGATTTTCAAGTGTCTTTTCTGCCTGCTCAGTTCCAG
TTGTCACGTA

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Gru, A. A. Pathology of T-Cell Lymphomas: Diagnosis and Biomarker Discovery. in *Non-Hodgkin Lymphoma* (eds. Evens, A. M. & Blum, K. A.) vol. 165 51–95 (Springer International Publishing, Cham, 2015).
2. Cancer Today. <https://gco.iarc.who.int/today/>.
3. Morton, L. M. *et al.* Etiologic Heterogeneity Among Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes: The InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. *JNCI Monographs* 2014, 130–144 (2014).
4. Plummer, M. *et al.* Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *The Lancet Global Health* 4, e609–e616 (2016).
5. Shiels, M. S. & Engels, E. A. Evolving epidemiology of HIV-associated malignancies. *Curr Opin HIV AIDS* 12, 6–11 (2017).
6. Estadísticas - Incidencia. *Argentina.gob.ar* <https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/incidencia> (2019).
7. Armitage, J. O. The aggressive peripheral T-cell lymphomas: 2013. *Am J Hematol* 88, 910–918 (2013).
8. Bellei, M. *et al.* T-Cell Lymphomas in South America and Europe. *Rev Bras Hematol Hemoter* 34, 42–47 (2012).
9. Skarbnik, A. P., Burki, M. & Pro, B. Peripheral T-Cell Lymphomas: A Review of Current Approaches and Hopes for the Future. *Front Oncol* 3, 138 (2013).
10. Iżykowska, K., Rassek, K., Korsak, D. & Przybylski, G. K. Novel targeted therapies of T cell lymphomas. *Journal of Hematology & Oncology* 13, 176 (2020).
11. Reddy, N. M. & Evens, A. M. Chemotherapeutic Advancements in Peripheral T-Cell Lymphoma. *Seminars in Hematology* 51, 17–24 (2014).
12. Dummer, R. *et al.* Cutaneous T cell lymphoma. *Nat Rev Dis Primers* 7, 1–22 (2021).
13. Goodlad, J., Cerroni, L. & Swerdlow, S. Recent advances in cutaneous lymphoma—implications for current and future classifications. *Virchows Arch* 482, 281–298 (2023).
14. Hennemann, G. *et al.* Plasma Membrane Transport of Thyroid Hormones and Its Role in Thyroid Hormone Metabolism and Bioavailability. *Endocrine Reviews* 22, 451–476 (2001).
15. Groeneweg, S., van Geest, F. S., Peeters, R. P., Heuer, H. & Visser, W. E. Thyroid Hormone Transporters. *Endocrine Reviews* 41, 146–201 (2020).
16. Ortiga-Carvalho, T. M., Sidhaye, A. R. & Wondisford, F. E. Thyroid hormone receptors and resistance to thyroid hormone disorders. *Nat Rev Endocrinol* 10, 582–591 (2014).
17. Paquette, M. A., Atlas, E., Wade, M. G. & Yauk, C. L. Thyroid Hormone Response Element Half-Site Organization and Its Effect on Thyroid Hormone Mediated Transcription. *PLOS ONE* 9, e101155 (2014).
18. Liu, Y.-C., Yeh, C.-T. & Lin, K.-H. Molecular Functions of Thyroid Hormone Signaling in Regulation of Cancer Progression and Anti-Apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 4986 (2019).
19. Dawson, M. I. & Xia, Z. The Retinoid X Receptors and Their Ligands. *Biochim Biophys Acta* 1821, 21–56 (2012).
20. Aranda, A. & Pascual, A. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiological Reviews* 81, 1269–1304 (2001).

21. Bergh, J. J. *et al.* Integrin $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ Contains a Cell Surface Receptor Site for Thyroid Hormone that Is Linked to Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase and Induction of Angiogenesis. *Endocrinology* 146, 2864–2871 (2005).
22. Davis, P. J., Mousa, S. A. & Lin, H.-Y. Nongenomic Actions of Thyroid Hormone: The Integrin Component. *Physiological Reviews* 101, 319–352 (2021).
23. Cayrol, F. *et al.* Integrin $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ acting as membrane receptor for thyroid hormones mediates angiogenesis in malignant T cells. *Blood* 125, 841–851 (2015).
24. Función tiroidea en la etapa fetal, neonatal y en el recién nacido prematuro. Necesidades de yodo. *Revista Española Endocrinología Pediátrica* (2014) doi:10.3266/RevEspEndocrinolPediatr.pre2014.Nov.255.
25. Jahn, G. A., Navas López, P. B. & Hapon, M. B. Efectos de las hormonas tiroideas sobre la función ovárica. (2010).
26. Barreiro Arcos, M. L. *et al.* Cooperative nongenomic and genomic actions on thyroid hormone mediated-modulation of T cell proliferation involve up-regulation of thyroid hormone receptor and inducible nitric oxide synthase expression. *J. Cell. Physiol.* 226, 3208–3218 (2011).
27. Cayrol, F. *et al.* Thyroid hormones modulate JAK/STAT oncogenic pathways via integrin $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ activation: Implications on bexarotene treatment for T-cell lymphomas. in vol. 83 (Fundación Revista Medicina, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, 2023).
28. Coe, D. *et al.* Loss of voltage-gated hydrogen channel 1 expression reveals heterogeneous metabolic adaptation to intracellular acidification by T cells. *JCI Insight* 7, (2022).
29. Patel, B. *et al.* Voltage gated proton channels modulate mitochondrial reactive oxygen species production by complex I in renal medullary thick ascending limb. *Redox Biology* 27, 101191 (2019).
30. Musset, B. *et al.* Aspartate 112 is the selectivity filter of the human voltage-gated proton channel. *Nature* 480, 273–277 (2011).
31. DeCoursey, T. E., Morgan, D., Musset, B. & Cherny, V. V. Insights into the structure and function of HV1 from a meta-analysis of mutation studies. *Journal of General Physiology* 148, 97–118 (2016).
32. DeCoursey, T. E. & Cherny, V. V. II. Voltage-activated Proton Currents in Human THP-1 Monocytes. *J. Membrane Biol.* 152, 131–140 (1996).
33. DeCoursey, T. E., Cherny, V. V., DeCoursey, A. G., Xu, W. & Thomas, L. L. Interactions between NADPH oxidase-related proton and electron currents in human eosinophils. *The Journal of Physiology* 535, 767 (2001).
34. Decoursey, T. E. Voltage-Gated Proton Channels and Other Proton Transfer Pathways. *Physiological Reviews* 83, 475–579 (2003).
35. Kawanabe, A., Takeshita, K., Takata, M. & Fujiwara, Y. ATP modulates the activity of the voltage-gated proton channel through direct binding interaction. *The Journal of Physiology* 601, 4073–4089 (2023).
36. B, M. *et al.* Zinc inhibition of monomeric and dimeric proton channels suggests cooperative gating. *The Journal of physiology* 588, (2010).
37. Hong, L., Kim, I. H. & Tombola, F. Molecular determinants of Hv1 proton channel inhibition by guanidine derivatives. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 9971–9976 (2014).

38. Arango Rincón, J. C., Gámez Díaz, L. Y. & López Quintero, J. Á. Sistema NADPH oxidasa: nuevos retos y perspectivas. *Iatreia* 23, 362–372 (2010).
39. Levine, A. P., Duchon, M. R., Villiers, S. de, Rich, P. R. & Segal, A. W. Alkalinity of Neutrophil Phagocytic Vacuoles Is Modulated by HVCN1 and Has Consequences for Myeloperoxidase Activity. *PLOS ONE* 10, e0125906 (2015).
40. Petheó, G. L. *et al.* Molecular and Functional Characterization of Hv1 Proton Channel in Human Granulocytes. *PLOS ONE* 5, e14081 (2010).
41. Capasso, M. *et al.* HVCN1 modulates BCR signal strength via regulation of BCR-dependent generation of reactive oxygen species. *Nat Immunol* 11, 265–272 (2010).
42. Lishko, P. V., Botchkina, I. L., Fedorenko, A. & Kirichok, Y. Acid Extrusion from Human Spermatozoa Is Mediated by Flagellar Voltage-Gated Proton Channel. *Cell* 140, 327–337 (2010).
43. Matsuyama, S., Llopis, J., Deveraux, Q. L., Tsien, R. Y. & Reed, J. C. Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nat Cell Biol* 2, 318–325 (2000).
44. Shanmugam, M., McBrayer, S. K. & Rosen, S. T. Targeting the Warburg effect in hematological malignancies: from PET to therapy. *Current Opinion in Oncology* 21, 531 (2009).
45. Becker, H. M. & Deitmer, J. W. Proton Transport in Cancer Cells: The Role of Carbonic Anhydrases. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 3171 (2021).
46. Spugnini, E. P. *et al.* Proton channels and exchangers in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1848, 2715–2726 (2015).
47. Wang, Y., Wu, X., Li, Q., Zhang, S. & Li, S. J. Human Voltage-Gated Proton Channel Hv1: A New Potential Biomarker for Diagnosis and Prognosis of Colorectal Cancer. *PLOS ONE* 8, e70550 (2013).
48. Wang, Y., Li, S. J., Wu, X., Che, Y. & Li, Q. Clinicopathological and Biological Significance of Human Voltage-gated Proton Channel Hv1 Protein Overexpression in Breast Cancer *. *Journal of Biological Chemistry* 287, 13877–13888 (2012).
49. Wang, Y., Zhang, S. & Li, S. J. Zn²⁺ induces apoptosis in human highly metastatic SHG-44 glioma cells, through inhibiting activity of the voltage-gated proton channel Hv1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 438, 312–317 (2013).
50. Wang, Y. *et al.* Specific expression of the human voltage-gated proton channel Hv1 in highly metastatic breast cancer cells, promotes tumor progression and metastasis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 412, 353–359 (2011).
51. Ventura, C. *et al.* Differential expression of the long and truncated Hv1 isoforms in breast-cancer cells. *Journal Cellular Physiology* 235, 8757–8767 (2020).
52. Asuaje, A. *et al.* The inhibition of voltage-gated H⁺ channel (HVCN1) induces acidification of leukemic Jurkat T cells promoting cell death by apoptosis. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 469, 251–261 (2017).
53. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25, 402–408 (2001).
54. Rauluseviciute, I. *et al.* JASPAR 2024: 20th anniversary of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Research* 52, D174–D182 (2024).

55. Llanos, M. A. *et al.* Novel Dimeric hHv1 Model and Structural Bioinformatic Analysis Reveal an ATP-Binding Site Resulting in a Channel Activating Effect. *J. Chem. Inf. Model.* 62, 3200–3212 (2022).
56. Schilling, T., Gratopp, A., DeCoursey, T. E. & Eder, C. Voltage-activated proton currents in human lymphocytes. *The Journal of Physiology* 545, 93–105 (2002).
57. Ghandi, M. *et al.* Next-generation characterization of the Cancer Cell Line Encyclopedia. *Nature* 569, 503–508 (2019).
58. Gonzalez, C., Koch, H. P., Drum, B. M. & Larsson, H. P. Strong cooperativity between subunits in voltage-gated proton channels. *Nat Struct Mol Biol* 17, 51–56 (2010).
59. Murata, Y., Iwasaki, H., Sasaki, M., Inaba, K. & Okamura, Y. Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor. *Nature* 435, 1239–1243 (2005).
60. Yu, T. *et al.* Metabolomics reveals mycoplasma contamination interferes with the metabolism of PANC-1 cells. *Anal Bioanal Chem* 408, 4267–4273 (2016).