



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“Efecto de la combinación astemizol-gefitinib en la proliferación y expresión del canal  
EAG1 en células de cáncer de cérvix”**

TESIS  
Que presenta

**LUIS ANTONIO AGUILAR ESLAVA**

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE  
FARMACOLOGÍA**

Directores de la tesis:

Dra. Janice García Quiroz  
Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo

**Ciudad de México**

**DICIEMBRE, 2017**

Este trabajo se realizó en el Departamento de Biología de la Reproducción “Dr. Carlos Gual Castro” del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán bajo dirección de la Dra. Janice García Quiroz y del Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo.

Gracias a CONACyT por la beca otorgada con el número 746400

**Dedico esta tesis a**

**A Dios, por permitirme terminar y ayudarme en cada paso que doy en mi vida, por no dejarme vencer y darme fuerza para continuar cuando pensé que estaba vencido.**

**A Mami, mi abuelita y mi tío Juan, tres ángeles que me protegen, inspiran para continuar y me enseñaron que la vida y el tiempo son dos regalos que no se deben desperdiciar.**

**A mi tía Viola, cuya vida y lucha fueron uno de los mayores motivos por los cuales decidí enfocar mi carrera a la investigación para ayudar a las personas con esta enfermedad.**

## **Agradecimientos**

**A mis Tutores, Dra. Janice García y Dr. Javier Camacho, por ser la guía en este camino, por aceptarme en sus grupos de trabajo y enseñarme el rumbo que tengo que seguir para poder llegar a ser un investigador ejemplar en un futuro, porque si soy una persona distinta a la que entró fue gracias a ustedes.**

**A mis Sinodales, Dra. María Eugenia Hidalgo y Dr. Carlos Cerda, por su tiempo y esfuerzo, gracias por todas su preguntas, sus correcciones y sus consejos ya que de esta forma se puede crecer y cambiar.**

**Al Dr. Fernando Larrea Gallo, jefe del departamento de Biología de la Reproducción “Dr. Carlos Gual Castro” del INCMNSZ, por permitirme forma parte de su grupo de trabajo y brindarme todo el apoyo necesario para poder realizar mi proyecto de manera exitosa.**

**A la Dra. Lorenza Díaz Nieto, al Dr. Euclides Avila Chávez y a la Dra. Rocío García Becerra, por su apoyo incondicional, sus consejos y su tiempo el cual para mi es el mejor regalo que alguien puede ofrecer; sin su apoyo este proyecto no seria posible.**

**Gracias a mis padres, Maricruz y Luis, porque siempre estuvieron conmigo y sus consejos y apoyo son las principales razones por las que siempre quiero ser el mejor.**

**A mi hermano, Emmanuel, porque su vida es una inspiración para mí y me recuerda que siempre debemos seguir nuestra vocación sin importar lo difícil que parezca.**

**A mi tío Carlos y mi tía Con, ya que sin su apoyo durante mi carrera profesional este sueño no sería posible y son una motivación más para siempre alcanzar lo más alto.**

**A mi tío Raúl, por ser una inspiración para mí y recordarme siempre que la educación y la preparación son las mejores armas que tenemos y que siempre debemos recordar de dónde venimos para estar seguros de nosotros mismos.**

**A Charly, Karlita y Tony, gracias por tomar el papel de hermanos mayores y siempre motivarme a buscar lo más alto, no olvido sus consejos y espero poder llegar a ser tan exitoso como ustedes, gracias por creer en mí.**

**A mi familia, la cual siempre está al pendiente de mis avances y me recuerda que la familia es lo más importante para tener la estabilidad que nos permite alcanzar el éxito.**

**A Vero, gracias por tu apoyo y tus consejos pero sobre todo por creer en mi cuando incluso yo deje de hacerlo, agradezco a Dios el poner en mi camino a una persona tan especial como tú.**

**A Bruno, Daniel y Yahel, mis amigos y hermanos, porque los mejores momentos de mi vida los he podido compartir con ustedes y saber que son personas exitosas en sus campos me motiva a querer ser el mejor en el mío, espero contar con ustedes siempre.**

**A mis amigos, los cuales me apoyaron y enseñaron que todos podemos ser mejores y además estamos obligados a alcanzar la mejor versión de nosotros mismos.**

**Al grupo de trabajo del INCMSZ, los cuales me ayudaron a realizar mi proyecto, no solo encontré en ellos compañeros de trabajo también son amigos que me extendieron la mano cuando más lo necesitaba.**

# ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN.....	16
1.1.- Cáncer de cérvix .....	16
1.2.- Incidencia y mortalidad de cáncer de cérvix.....	17
1.3.- Clasificación del cáncer de cérvix .....	18
1.3.1. Carcinoma de células escamosas.....	19
1.3.2. Adenocarcinomas .....	19
1.4.- Tratamiento del cáncer de cérvix .....	20
1.4.1. Tratamiento local.....	20
1.4.2. Tratamiento sistémico .....	21
1.5.- Receptor al factor de crecimiento epidérmico humano tipo 1 (EGFR) .....	22
1.6.- Canal de potasio éter à-go-go 1 (EAG1).....	23
1.7.- EAG1 y cáncer cervical .....	24
1.8.- Astemizol como antineoplásico en diferentes tipos de cáncer.....	25
1.9.- Gefitinib como antineoplásico en diferentes tipos de cáncer.....	27
1.10.- Efecto del astemizol y gefitinib en una terapia combinada en la línea celular de cáncer de pulmón A549.....	29
II.- JUSTIFICACIÓN .....	31
III.- HIPÓTESIS .....	32
IV.- OBJETIVOS .....	33
4.1.- Objetivo general.....	33
4.2.- Objetivos específicos .....	33
V.- MATERIALES Y MÉTODOS .....	34
5.1.- Reactivos.....	34
5.2.- Cultivo celular.....	34
5.3.- Inmunocitoquímica (ICQ).....	34
5.4.- Estudios de Proliferación .....	35
5.5.- Determinación de las concentraciones inhibitorias (CI) y del índice de combinación (IC)..	35
5.6.- Estudios de expresión génica .....	36
5.6.- Análisis estadístico.....	37
VI.- RESULTADOS .....	38

6.1.- Caracterización de las líneas celulares utilizadas .....	38
6.2.- Efectos antiproliferativos del gefitinib y del astemizol en las células de cáncer de cérvix ..	39
6.3.- Efecto de la combinación gefitinib y astemizol en la proliferación celular .....	40
6.4.- Cálculo del índice de combinación (IC) .....	42
6.5.- Efecto del astemizol y/o gefitinib en la expresión de EAG1 .....	42
VII.- DISCUSIÓN.....	44
VIII.- CONCLUSIÓN.....	48
IX.- PERSPECTIVAS.....	49
X.- Lista de siglas, símbolos y abreviaturas.....	9
XI.- Lista de tablas .....	10
XII.- Lista de Figuras .....	11
XIII.- REFERENCIAS.....	50

## X.- Lista de siglas, símbolos y abreviaturas

<b>Sigla, Símbolo o Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>CI</b>	Concentración inhibitoria
<b>CI<sub>20</sub></b>	Concentración inhibitoria 20
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentración inhibitoria 50
<b>IC</b>	Índice de combinación
<b>ICQ</b>	Inmunocitoquímica
<b>PMS</b>	<i>N</i> -metildibenzopirazina metil sulfato
<b>qPCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
<b>RT</b>	Transcriptasa reversa
<b>SFB</b>	Suero fetal de bovino
<b>EAG1</b>	Éter à go-go-1
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>EGFR</b>	Receptor para el factor de crecimiento epidérmico humano tipo 1
<b>ErbB</b>	Subfamilia de los receptores con dominios tirosina cinasa
<b>HER 2</b>	Receptor para el factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2
<b>HER 3</b>	Receptor para el factor de crecimiento epidérmico humano tipo 3
<b>LIE</b>	Lesión intraepitelial escamosa
<b>NIC</b>	Neoplasia intraepitelial cervical
<b>VPH</b>	Virus del papiloma humano
<b>XTT</b>	Sal sódica de la 2, 3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2 <i>H</i> -tetrazolio-5-carboxanilida

## **XI.- Lista de tablas**

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>
<b>Tabla 1</b>	Gefitinib como antineoplásico en cáncer de mama, cérvix e hígado
<b>Tabla 2</b>	Sondas y oligonucleótidos utilizados
<b>Tabla 3</b>	Caracterización celular
<b>Tabla 4</b>	Concentraciones inhibitorias (CI) del astemizol y del gefitinib en las líneas celulares
<b>Tabla 5</b>	Valores del índice de combinación (IC)
<b>Tabla 6</b>	Concentraciones terapéuticas y tóxicas de astemizol

## XII.- Lista de Figuras

<b>Figura</b>	<b>Título</b>
<b>Figura 1</b>	Incidencia de neoplasias en la población femenina
<b>Figura 2</b>	Aspecto citológico de muestras correspondientes a neoplasia intraepitelial cervical (NIC) en distintos estadios
<b>Figura 3</b>	Efecto antineoplásico del astemizol en células de carcinoma mamario humano
<b>Figura 4</b>	Efecto antiproliferativo de astemizol en líneas celulares de cáncer de cérvix
<b>Figura 5</b>	El gefitinib inhibe la proliferación en células de cáncer de cérvix
<b>Figura 6</b>	El gefitinib inhibe la proliferación en células de cáncer de mama
<b>Figura 7</b>	Efecto de la combinación astemizol-gefitinib en la proliferación celular y apoptosis de las células de cáncer de pulmón A549
<b>Figura 8</b>	Inmunocitoquímica de EAG1 y EGFR
<b>Figura 9</b>	Efectos antiproliferativos del astemizol y del gefitinib en células de cáncer de cérvix
<b>Figura 10</b>	Efectos antiproliferativos ejercidos por el astemizol (A) y el gefitinib (G) per se y en combinación en células de cáncer de cérvix
<b>Figura 11</b>	Efecto de la combinación astemizol-gefitinib en la expresión génica de EAG1

## RESUMEN

El cáncer cervicouterino es una de las principales causas de muerte en el mundo en mujeres mayores de 25 años, si bien la tasa de mortalidad por dicho cáncer ha disminuido debido a la detección temprana y prevención a través del uso de la prueba de Papanicolaou y más recientemente al uso de las vacunas contra el virus del papiloma humano (VPH), la enfermedad aún persiste como un problema de salud pública serio. Para el tratamiento del cáncer cervicouterino no hay una terapia dirigida como tal, por lo que el tratamiento de estos pacientes se ve cercado al uso de la quimioterapia. Si bien la quimioterapia ha sido utilizada como el tratamiento sistémico de elección por muchos años, esta ofrece beneficios limitados a los pacientes debido a la alta toxicidad. Por lo tanto, el tratamiento del cáncer usando compuestos no tóxicos dirigidos contra proteínas blancos específicos que se expresen en alto porcentaje en los tumores de cérvix constituye una estrategia prometedora para el manejo de la enfermedad. Considerando lo anterior, este estudio se centró en el bloqueo de dos biomarcadores: el canal de potasio éter à-go-go tipo 1 (EAG1) y el receptor al factor de crecimiento epidérmico humano tipo 1 (EGFR), que se sobre-expresan en tejido neoplásico de cérvix. La expresión de EAG1 se encuentra confinada al sistema nervioso central; sin embargo, su expresión ectópica se asocia con desarrollo tumoral. En consecuencia, la inhibición de su expresión o actividad disminuyen la proliferación de células neoplásicas *in vitro* e *in vivo*, por lo que se considera un marcador tumoral y blanco terapéutico en diferentes tipos de cáncer incluido el cervicouterino. El astemizol, un antihistamínico H<sub>1</sub>, bloquea la actividad del canal EAG1 y disminuye la proliferación de células neoplásicas *in vitro* e *in vivo*. Por otra parte, el EGFR, miembro de la familia de receptores tirosina-cinasa, se encuentra sobre expresado en diferentes tejidos neoplásicos donde promueve proliferación celular exacerbada. La sobreexpresión de EGFR en cáncer de cérvix se relaciona con pobre respuesta a la quimioterapia, progresión tumoral y aumento en la migración a otros órganos. El gefitinib, inhibidor del EGFR, utilizado en la clínica para el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico, también inhibe la proliferación de líneas celulares que sobre-expresan su blanco de acción, como es el caso del cáncer de mama. Con base en lo anterior, este estudio se centró en evaluar el efecto *per se* y en conjunto del astemizol y del gefitinib en la proliferación de las líneas celulares de cáncer cervicouterino SiHa y HeLa. Tanto el astemizol como el gefitinib inhibieron la proliferación en ambas líneas celulares de manera

dependiente de la concentración. Con base en las curvas de concentración-respuesta se determinaron las concentraciones inhibitorias al 20% (CI<sub>20</sub>) y 50% (CI<sub>50</sub>) de astemizol y gefitinib en células HeLa (astemizol: CI<sub>20</sub>, 3.76 μM y CI<sub>50</sub>, 4.26 μM; gefitinib: CI<sub>20</sub>, 9.30μM y CI<sub>50</sub>, 12.23μM) y células SiHa (astemizol CI<sub>20</sub>, 4.28 μM CI<sub>50</sub>, 4.59 μM; gefitinib: CI<sub>20</sub>, 8.44 μM CI<sub>50</sub>, 10.82 μM), mismas que se tomaron como base para los esquemas de combinación. La administración concomitante de gefitinib-astemizol inhibió de manera sinérgica la proliferación celular en todos los esquemas de combinación probados. Por otra parte se evaluó el efecto de los compuestos solos o en combinación en la expresión génica de EAG1, con el objetivo de dilucidar en parte el mecanismo antiproliferativo del gefitinib y del astemizol; no obstante, los tratamientos no modificaron la expresión del canal. Estos resultados proporcionan bases científicas para extrapolar el estudio a ensayos *in vivo*.

## ABSTRACT

Cervical cancer is one of the leading causes of death in women over 25 years of age, although the mortality rate due to cancer has decreased due to early detection and prevention through the use of Papanicolaou test and more recently to the use of vaccines against the human papilloma virus (HPV), the disease still persists as a serious public health problem. For the treatment of cervical cancer there is no targeted therapy, so the treatment of these patients is chemotherapy in many cases. Although chemotherapy has been used as the systemic treatment of choice for many years, it offers limited benefits to patients due to its high toxicity. Therefore, the treatment of cancer with non-toxic compounds directed against specific proteins highly expressed in cervical tumors is a promising strategy for the management of the disease. This study focused on the blocking of two biomarkers: the ether  $\alpha$ -go-go type 1 potassium channel (EAG1) and the human epidermal growth factor-1 receptor (EGFR), which are overexpressed in neoplastic tissue of the cervix. The expression of EAG1 is confined to the central nervous system; however, its ectopic expression is associated with tumor development. Consequently, the inhibition of its expression or activity decreases the proliferation of neoplastic cells *in vitro* and *in vivo*, then, EAG1 is considered a tumor marker and therapeutic target for different types of tumours including cervical cancer. Astemizole is an H1-antihistamine agent that blocks the activity of the EAG1 channel and decreases the proliferation of neoplastic cells *in vitro* and *in vivo*. On the other hand, EGFR is a member of the tyrosine kinase receptor family, and is expressed in different neoplastic tissues. The overexpression of EGFR in cancer is related to the response to chemotherapy, tumor progression and increased migration to other organs. Gefitinib is an EGFR inhibitor, used in the clinic for the treatment of non-small cell lung cancer, it also inhibits the proliferation of cell lines that express its target, such as breast cancer. This study focused on evaluating the effect of astemizole and gefitinib and its combination on the proliferation of the cervical cancer cell lines SiHa and HeLa. Both astemizole and gefitinib inhibited proliferation in both cell lines in a concentration-dependent manner. Based on the concentration-response curves obtained, the inhibitory concentrations were determined at 20% ( $IC_{20}$ ) and 50% ( $IC_{50}$ ) of astemizole and gefitinib in HeLa cells (astemizole:  $IC_{20}$ , 3.76  $\mu$ M and  $IC_{50}$ , 4.26  $\mu$ M and gefitinib:  $IC_{20}$ , 9.30  $\mu$ M and  $IC_{50}$ , 12.23  $\mu$ M) and SiHa cells (astemizole  $IC_{20}$ , 4.28  $\mu$ M  $IC_{50}$ , 4.59  $\mu$ M, gefitinib:  $IC_{20}$ , 8.44  $\mu$ M  $IC_{50}$ , 10.82  $\mu$ M), which were used for the combination

schemes. The concomitant administration of gefitinib-astemizole synergistically inhibited cell proliferation in all the combination schemes tested. On the other hand, the effect of the compounds alone or in combination on the gene expression of EAG1 was evaluated, in order to partially elucidate the antiproliferative mechanism of gefitinib and astemizole. The treatments did not modify the expression of the channel. These results provide scientific basis for extrapolating the study to *in vivo* assays.

## **I.- INTRODUCCIÓN**

“Los tumores destruyen al hombre en una única y espantosa manera, como carne de su propia carne que de alguna forma se ha vuelto proliferativa, desenfrenada, depredadora e ingobernable. Son las más concretas y formidables de las enfermedades humanas, sin embargo a pesar de más de 70 años de estudio experimental siguen siendo las menos comprendidas” (Francis Peyton Rous, Virólogo, Premio Nobel de Fisiología, 1966).

El cáncer resulta de la acumulación de daños en genes específicos que controlan funciones esenciales para las células normales, estos genes pertenecen a dos grupos, los *oncogenes* y los *genes supresores de tumores* que tienen como tareas principales mantener el funcionamiento celular adecuado, controlando la proliferación y la apoptosis de todas las células del organismo. Las características que distinguen a las células neoplásicas de las células normales son: 1) presentan proliferación celular descontrolada y 2) son capaces de invadir y colonizar tejidos distantes. Estas características son las que hacen que las células neoplásicas sean peligrosas ya que pueden generar tumores en otros órganos y afectar sus funciones. Los tumores que se mantienen agrupados en una masa única se consideran benignos y se pueden extirpar quirúrgicamente; no obstante, si las células neoplásicas invaden tejido circundante y producen metástasis, el tumor se considera maligno. El desarrollo tumoral abarca distintas etapas: 1) iniciación, en la cual se establece el daño al material genético, 2) promoción, caracterizada porque las células con el material genético dañado empiezan a proliferar descontroladamente y 3) progresión, en la cual las células tumorales se agrupan y forman un tumor (Jiménez and Merchant, 2003).

De los diferentes tipos de cáncer, el cáncer cervicouterino aún persiste como un problema de salud pública serio, a pesar de ser una de las neoplasias con mayor potencial de prevención.

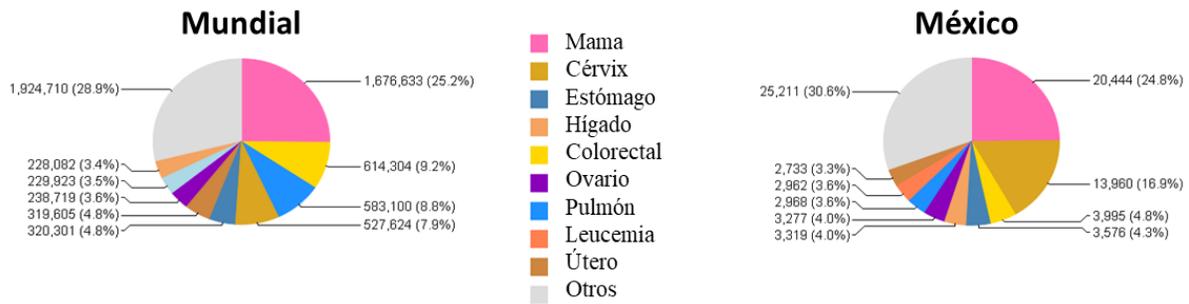
### **1.1.- Cáncer de cérvix**

El principal factor de riesgo del cáncer cervical es la infección por el virus del papiloma humano (VPH). Los genotipos más comunes del VPH son el 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58; no obstante, las variedades 16 y 18 son designados como oncogénicos o de alto riesgo. Estos

virus transmitidos sexualmente son asociados con más del 95% del cáncer cervical y en particular el VPH-16 por si solo es responsable del desarrollo de esta neoplasia en un 60 % de la población infectada. Los oncogenes del VPH (E6 y E7) inactivan a la proteína supresora de tumores p53 y pRb en la célula hospedera induciendo mecanismos de transformación y proliferación celular descontrolada. (Peralta-Zaragoza *et. al.*, 2012; American Cancer Society, 2017). Otros factores de riesgo para el desarrollo del cáncer cervical incluyen el fumar y el uso de anticonceptivos (American Cancer Society, 2017). A pesar de que se cuenta con intervenciones efectivas para la prevención y detección oportuna del cáncer cervicouterino, como las vacunas contra el VPH, el papanicolaou y la colposcopia, esta neoplasia sigue teniendo enormes repercusiones para las mujeres de todo el mundo.

### **1.2.- Incidencia y mortalidad de cáncer de cérvix.**

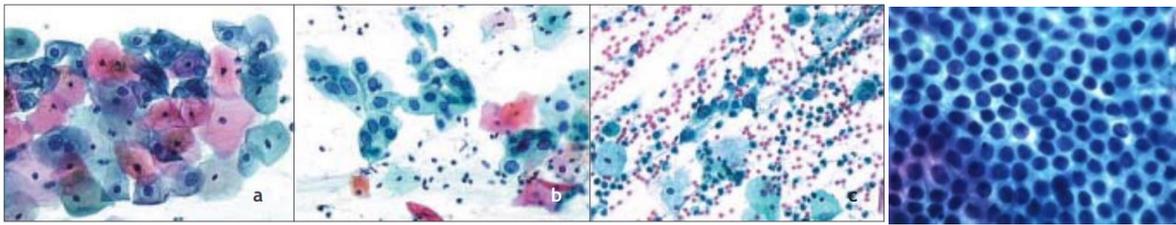
El cáncer cervicouterino constituye una de las principales causas de muerte en el mundo en mujeres mayores de 25 años. De acuerdo a las estadísticas reportadas por el Globocan en el 2012, a nivel mundial se registraron más de 500,000 nuevos casos por año y alrededor de 260,000 defunciones (figura 1). En lo que respecta a nuestro país, se reportaron 13,960 nuevos casos y 4,769 defunciones (figura 1), que representa una razón mortalidad-incidencia del 34.2%. (Disponible en [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population); Fecha de acceso 13 de Noviembre del 2017). Con base en lo anterior es necesario fortalecer la investigación orientada a comprender los procesos implicados en la génesis, promoción y progresión de la enfermedad para encontrar nuevas formas de diagnóstico oportuno y tratamientos.



**Figura 1. Incidencia de neoplasias en la población femenina.** Incidencia de neoplasias a nivel mundial (izquierda) y en México (derecha). Los números denotan los nuevos casos de cada neoplasia y entre paréntesis se muestra el porcentaje de incidencias, en comparación al total de neoplasias. En color naranja se muestra el cáncer de cérvix. Adaptado de [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx) (Fecha de acceso: 13 de Noviembre del 2017).

### 1.3.- Clasificación del cáncer de cérvix

El cáncer cervical comienza en las células que recubren el cérvix y la parte inferior del útero. Las células del endocervix (células glandulares) y las del exocervix (células escamosas) forman la zona de transformación y es aquí donde la mayoría de los cánceres cervicales comienzan. La transformación de células normales a células neoplásicas no es inmediata, es progresiva, dando lugar a distintas etapas pre-cancerígenas. (Richart, 1990). En 1990 se propuso una terminología histopatológica basada en dos grados de la enfermedad: neoplasia intraepitelial cervical (NIC) de bajo grado y NIC de alto grado. La NIC de bajo grado comprende las anomalías compatibles con presencia de coilocitos (células atípicas que indican cambios en el tejido ocasionados por la presencia de VPH) y las lesiones referentes a la NIC grado 1 (figura 2a); mientras que la NIC de alto grado abarca a las NIC grado 2 y NIC grado 3 (figura 2b-c) y se considera que son precursoras del cáncer invasor (Richart, 1990).



**Figura 2. Aspecto citológico de muestras correspondientes a neoplasia intraepitelial cervical (NIC) en distintos estadios.** La NIC puede detectarse por examen microscopio de las células cervicales en un frotis teñido por la técnica de Papanicolau. Las microfotografías muestran imágenes correspondientes a NIC grado 1 (a), NIC grado 2 (b), NIC grado 3 (c) y Frotis Normal (d) (Richart, 1990).

Si bien el cáncer cervical inicia a partir de las células pre-cancerígenas solo algunas lesiones progresan a cáncer cervical. Las células pre-cancerígenas tardan varios años en cambiar a cancerígenas; no obstante también pueden hacerlo en tan solo un año, por lo que se recomienda revisión periódica, ya que tratar las etapas pre-cancerígenas puede evitar la mayoría de los cánceres cervicales (Shingleton, 1968).

Los principales tipos de cáncer cervical son: carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma (Yoshikazu *et. al.*, 2003).

### **1.3.1. Carcinoma de células escamosas**

El carcinoma de células escamosas es el cáncer cervical más común, 9 de cada 10 casos corresponden a este tipo de cáncer, el cual se desarrolla en la zona de transformación, específicamente en las células del exocervix (Chavaro *et. al.*, 2009).

### **1.3.2. Adenocarcinomas**

Los adenocarcinomas se desarrollan en el endocervix, a partir de la transformación de las células glandulares cuya función radica en la producción de moco cervical (Chavaro *et. al.*, 2009).

## **1.4.- Tratamiento del cáncer de cérvix.**

El tratamiento del cáncer cervicouterino es variable según la etapa clínica en la que se encuentre la paciente al momento del diagnóstico y este puede ser de tipo local y/o sistémico.

### **1.4.1. Tratamiento local**

En etapas tempranas se pueden hacer tratamientos conservadores de la fertilidad, si es que la paciente no tiene paridad satisfecha como conización cervical o cervicectomía. Para las mujeres con paridad satisfecha, la mejor opción de tratamiento es la histerectomía radical.

**Cervicectomía:** Mediante este procedimiento, las mujeres tratadas no pierden la capacidad de tener hijos. La operación se puede realizar a través de la vagina o el abdomen y en ocasiones se hace mediante laparoscopia. En este procedimiento se extirpa el cuello uterino y la parte superior de la vagina, pero no el cuerpo del útero (Cetina *et. al.*, 2009).

**Histerectomía:** Esta cirugía puede ser de dos tipos, simple o radical. En la histerectomía simple se extirpa el útero pero no las estructuras próximas a este. Mientras que en la histerectomía radical se extirpa el útero junto con los tejidos contiguos al mismo, así como la parte superior de la vagina adyacente al cuello uterino (Cetina *et. al.*, 2009).

De manera general, la cirugía se apoya de la radioterapia para tener mejor efecto en el tratamiento. Los dos tipos de radioterapia que se usan con más frecuencia para tratar el cáncer de cérvix son la radioterapia externa y la braquiterapia (Cetina *et. al.*, 2009).

**Radioterapia externa:** La radioterapia externa consiste en la administración de rayos X desde afuera del cuerpo hacia el tejido neoplásico, el tratamiento es muy similar a una radiografía regular, pero la dosis de radiación es más intensa (Uno *et. al.*, 2006).

**Braquiterapia:** La braquiterapia también se conoce como radioterapia interna y en ocasiones sirve como apoyo de la radioterapia externa. En este tipo de radioterapia se coloca una fuente de radiación en un dispositivo que se encuentre en el tejido neoplásico o cerca de este, como la vagina o el cuello del útero (Uno *et. al.*, 2006).

La cirugía y la radioterapia se utilizan para la mayoría de los pacientes con cáncer de cérvix en etapas iniciales, pero cuando el cáncer es recurrente o en etapas avanzadas se recurre a la quimioterapia la cual se puede administrar concomitantemente con la radioterapia.

#### **1.4.2. Tratamiento sistémico**

Los esquemas de quimioterapia para el tratamiento del cáncer cervicouterino son:

**El cisplatino:** se administra concomitante con la radiación. El esquema de tratamiento es semanal, de manera intravenosa y 4 horas antes de recibir la radiación (Dueñas-González *et. al.*, 2010).

**El cisplatino–5-fluorouracilo:** se administra cada 4 semanas de manera concomitante con la radiación (Dueñas-González *et. al.*, 2010).

Si bien el cisplatino ha sido utilizado como la quimioterapia de elección para el tratamiento del cáncer cervicouterino por muchos años, éste ofrece beneficios limitados a las pacientes debido a la alta toxicidad, no obstante su uso es imprescindible ya que no hay una terapia dirigida como tal. Lo más dirigido para el tratamiento del cáncer de cérvix es el bevacizumab, el cual bloquea al factor de crecimiento endotelial vascular e inhibe la angiogénesis (Dueñas-González *et. al.*, 2010).

Con base en lo anterior, el tratamiento del cáncer cervicouterino usando compuestos no tóxicos dirigidos contra proteínas blancos específicos que se expresen en alto porcentaje en los tumores de cérvix constituye una estrategia prometedora para el manejo de la enfermedad. Al respecto, el canal de potasio éter à-go-go tipo 1 (Eag1) y el receptor al factor de crecimiento epidérmico humano tipo 1 (EGFR), se sobre-expresan en tejido neoplásico de cérvix, en un 92% y 91% respectivamente (Carreón *et. al.*, 2012; Gómez Varela *et. al.*, 2006).

## 1.5.- Receptor al factor de crecimiento epidérmico humano tipo 1 (EGFR)

El EGFR pertenece a la familia de los receptores con dominios tirosina cinasa (ErbB) y tiene funciones de gran importancia tanto en las células normales como en las células neoplásicas. Una vez que el ligando se une al EGFR se llevan a cabo cambios conformacionales en los dominios extracelulares e intracelulares de las cinasas de tirosina, dando como resultado la transfosforilación de los residuos de tirosina en el extremo carboxilo-terminal. Las tirosinas fosforiladas se convierten en sitios de unión para moléculas señalizadoras que pueden inducir evasión de la apoptosis, proliferación, invasión y metástasis, entre otros procesos que son de suma importancia para el fenotipo de las células neoplásicas. En diferentes tipos de cáncer se han encontrado mutaciones en el gen EGFR, particularmente en el dominio cinasa (Carreón *et. al.*, 2012). Existen 3 tipos de mutaciones reportadas en el gen EGFR: EGFRvI, EGFRvII y EGFRvIII. La más común de estas mutaciones es la EGFRvIII, que conlleva a la sobreexpresión de EGFR's constitutivamente activos y se presenta en el 50% de los glioblastomas y en el 5% de los carcinomas de células escamosas de cáncer de pulmón. Las anomalías en las funciones del EGFR se asocian con características clave para el desarrollo del cáncer, como son: proliferación celular exacerbada, invasión, angiogénesis y potencial metastásico. Varios estudios han demostrado que la sobre expresión del EGFR en tejido neoplásico se correlaciona con baja supervivencia y mal pronóstico, además existe mayor riesgo de recurrencia y en estadio tumoral avanzado aumenta el riesgo de metástasis. (Carreón *et. al.*, 2012).

En el tejido cervical la expresión de EGFR es casi nula en el tejido sano, pero en el tejido neoplásico de cérvix la expresión de EGFR aumenta conforme avanza el grado de la lesión. La expresión del EGFR en el cáncer de cérvix y su progresión vuelven a este receptor una proteína blanco de gran importancia (Reyes *et. al.*, 2014).

Con base en lo anterior, los fármacos que bloquean la acción del EGFR son opciones terapéuticas novedosas que pueden tener pronóstico favorable en diferentes tipos de cáncer. El gefitinib, inhibidor de la tirosina-cinasa del EGFR catalogado también como inhibidor de la transducción de señales a través de este, es el fármaco de primera elección para el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico localmente avanzado o metastásico (Gazdar,

2009). Existen diferentes mutaciones en el EGFR que pueden conferir sensibilidad al gefitinib o bien generar resistencia a éste. Las mutaciones que confieren sensibilidad al gefitinib por el EGFR son mutaciones clásicas como la delección en el exón 19 y la sustitución puntual L858R en el exón 21, las cuales se presentan con mayor frecuencia en el cáncer de pulmón no microcítico. Por otro lado, las mutaciones mediadas por los oncogenes KRAS y MET confieren insensibilidad al fármaco, como es la mutación puntual T790M que genera resistencia al gefitinib, por lo que los inhibidores de la tirosina cinasa del EGFR de segunda generación buscan evitar la resistencia mediada por esta mutación (Gazdar, 2009).

### **1.6.- Canal de potasio éter à-go-go 1 (EAG1)**

Los canales iónicos son proteínas de membrana que permiten el paso de iones a través de esta, dichas proteínas tienen funciones importantes en el organismo como son la transmisión neuronal, el latido del corazón, la contracción muscular, la secreción de insulina, la activación del sistema inmune y la proliferación celular (Pardo and Stühmer, 2013). Los canales de potasio dependientes de voltaje se relacionan con gran número de enfermedades incluyendo cáncer. Entre todos los canales relacionados con el desarrollo de cáncer EAG1 ha ganado gran interés.

La expresión de EAG1 se encuentra prácticamente confinada al sistema nervioso central; sin embargo, su expresión exacerbada fuera de dicho sitio se asocia en primera instancia con la progresión del cáncer y con pobre esperanza de vida (Hemmerlein *et. al.*, 2006; Camacho, 2006; Pardo and Stumer, 2008). El canal EAG1 presenta alto potencial oncogénico de acuerdo a lo demostrado por Pardo y colaboradores en 1999, en cuyos experimentos *in vitro* se evidenció que la transfección de Eag1 a las células confiere un fenotipo canceroso; es decir, pierden la inhibición por contacto formando cúmulos, así como la dependencia a factores de crecimiento presentando alta síntesis de DNA y actividad metabólica (Pardo *et. al.*, 1999).

La expresión de EAG1 ha sido detectada en varias líneas celulares tumorales incluyendo IGR-1, SHSY-5Y, HeLa y MCF-7; derivadas de melanoma, neuroblastoma, cérvix y mama, respectivamente (Pardo *et. al.*, 1999; Gavriloova-Ruch *et. al.*, 2002); así como en cultivos primarios de cáncer cervical y de mama (Farías *et. al.*, 2004; García-Becerra *et.*

*al.*, 2010). Su expresión también ha sido detectada en los tejidos neoplásicos de mama, cérvix, próstata, hígado, ovario, endometrio, tiroides, colon y pulmón, por lo que EAG1 ha sido identificado como nuevo blanco oncológico presente en diferentes tipos de tumores (Hemmerlein *et. al.*, 2006; Farías *et. al.*, 2004; García-Becerra *et. al.*, 2010), ya que la inhibición de su expresión con oligonucleótidos antisentido en diferentes líneas celulares tumorales, entre ellas de cáncer de mama, causa extensa reducción de la síntesis de DNA (Pardo *et. al.*, 1999). De manera similar, la inhibición de corrientes mediadas a través del canal Eag1, con el uso de anticuerpos monoclonales y diversos fármacos disminuye la proliferación celular (Gómez-Varela *et. al.*, 2007). Con base en lo anterior, el EAG1 puede fungir como excelente biomarcador para diagnóstico y tratamiento en distintos tipos de cáncer, incluido el de cérvix (Rodríguez-Rasgado *et. al.*, 2012; Pardo and Stühmer, 2008).

### **1.7.- EAG1 y cáncer cervical**

La relación entre el canal de potasio EAG1 y el cáncer cervical se ha estudiado con anterioridad en nuestro grupo de trabajo. Experimentos con PCR y Southern-blot demostraron la expresión de EAG1 en el 100% de las muestras de cáncer de cérvix obtenidas (13 muestras) Debido a la expresión del canal en las muestras de cáncer cervicouterino y los antecedentes previos sobre su participación en otros tipos de cáncer, se ha sugerido que tiene un papel importante en la proliferación celular de estas células. Los resultados previos apoyan la idea de que el canal EAG1 puede funcionar como biomarcador y objetivo terapéutico en cáncer cervical (Farias *et. al.*, 2004).

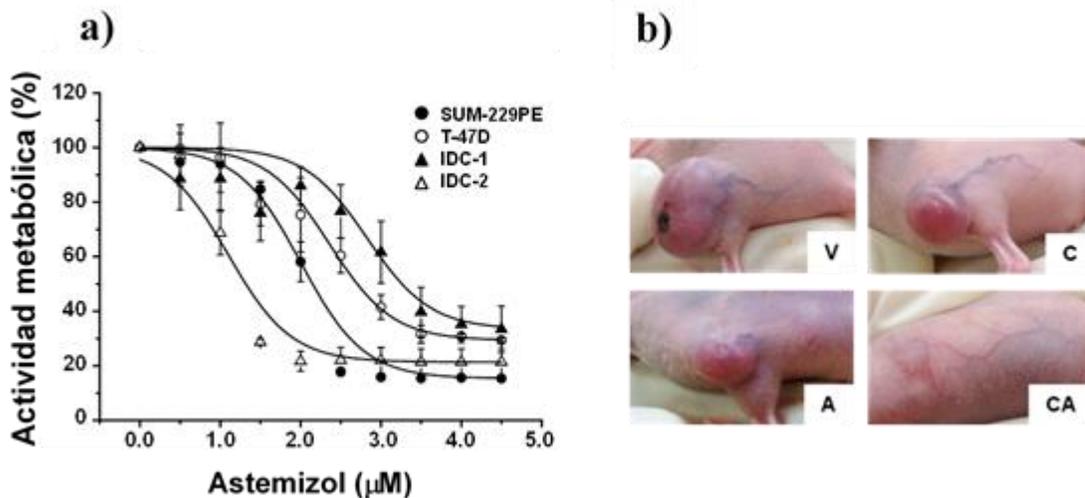
Debido a su elevada presencia en tumores de cáncer de cérvix, como se mostró con anterioridad ya que en 13 muestras de tejido de adenocarcinoma endocervical se observó la expresión de EAG1, a su relación con la infección de VPH y al ser un indicador de proliferación celular que puede conducir a tumores malignos podemos considerar a este canal como un marcador temprano y un blanco terapéutico en las primeras etapas del cáncer de cérvix (Díaz *et. al.*, 2009).

En los últimos 10 años la investigación para encontrar nuevas formas de tratamiento en diferentes tipos de cáncer se ha enfocado en fármacos que bloqueen el canal EAG1, uno de estos fármacos es el astemizol.

## 1.8.- Astemizol como antineoplásico en diferentes tipos de cáncer

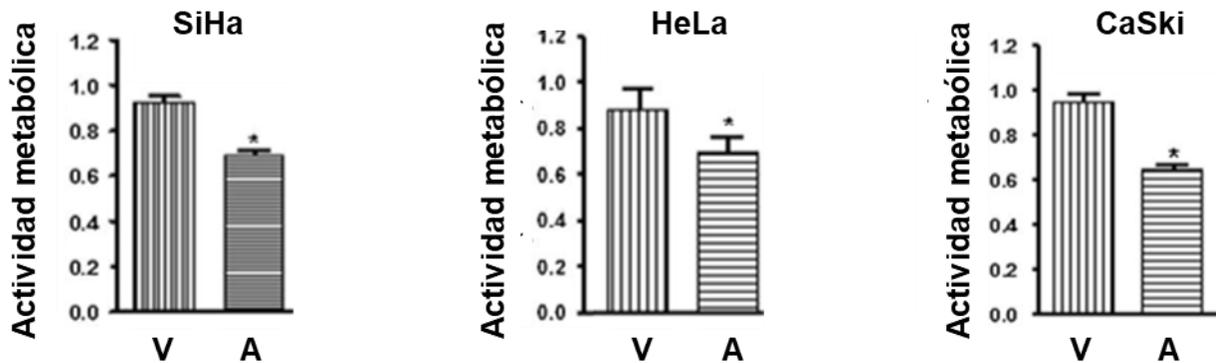
El astemizol, un antihistamínico de segunda generación usado para el tratamiento de alergias también tiene efectos antineoplásicos atribuidos al bloqueo no selectivo de los canales EAG1, HERG, receptores de histamina 1 y 3, transportadores ABC y al remodelamiento de la cromatina. La mayoría de estos blancos están relacionados con el desarrollo de cáncer, lo que hace que el astemizol pueda fungir como un tratamiento muy eficaz para tratar dicha enfermedad (García-Quiroz and Camacho, 2011; Chen *et. al.*, 2011).

El astemizol atraviesa la membrana celular en su forma no cargada y se une al canal Eag1 del lado intracelular en su forma cargada, bloqueando así la actividad del canal (García-Ferreiro *et. al.*, 2004) y con ello la proliferación celular (García-Becerra *et. al.*, 2010; Roy *et. al.*, 2008, García-Quiroz *et. al.*, 2012). En estudios *in vitro*, el astemizol disminuye la proliferación de las células en las líneas celulares y los cultivos primarios del cáncer de mama (figura 3 panel a), así como queratinocitos transfectados con Eag1 (García-Becerra *et. al.*, 2010; Roy *et. al.*, 2008; Díaz *et. al.*, 2009; Ouadid-Ahidouch *et. al.*, 2004). En lo que respecta a los estudios *in vivo*, el astemizol a la dosis de 50 mg/kg de peso inhibe el crecimiento tumoral en ratones inmunodeprimidos xenotransplantados con células de cáncer de mama, como se muestra en la figura 3 panel b. Se puede observar como en el ratón vehículo hay un crecimiento tumoral pero al aplicar astemizol o calcitriol por separado el tamaño del tumor disminuye y al combinar los fármacos el crecimiento del tumor es prácticamente nulo. (Downie *et. al.*, 2008; García-Quiroz *et. al.*, 2014)



**Figura 3. Efecto antineoplásico del astemizol en células de carcinoma mamario humano.** a) El astemizol inhibe la actividad metabólica de diversas líneas celulares (SUM-229PE y T-47D) y cultivos primarios (invasivo ductal carcinoma 1: IDC-1; invasivo ductal carcinoma 2: IDC-2) de cáncer de mama de manera significativa (diferencia significativa a partir de 1 µM en IDC-2 y 1.5 µM para el resto de las líneas celulares) y dependiente de la concentración. b) Fotografías representativas del tumor de IDC-2 al final del tratamiento con vehículo (V), astemizol (A), calcitriol (C) y su coadministración (CA). El calcitriol y el astemizol inhibieron *per se* el crecimiento tumoral; no obstante, el efecto antineoplásico fue mayor con la coadministración. (Adaptado de García-Quiroz *et. al.*, 2012).

Por otra parte, el efecto antineoplásico del astemizol también se ha evaluado en células de cáncer de cérvix. El astemizol a una concentración de 5 µM inhibe la actividad metabólica (reflejo de la proliferación celular) de las líneas celulares de cáncer de cérvix SiHa, HeLa y CaSki, como se observa en la figura 4 (Chávez-López *et. al.*, 2014).

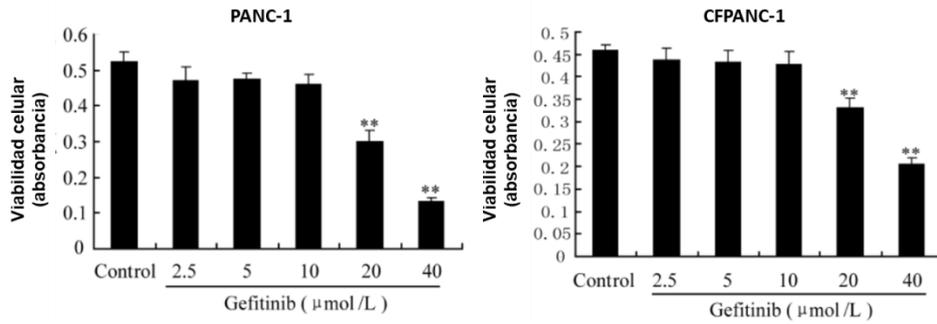


**Figura 4. Efecto antiproliferativo de astemizol en líneas celulares de cáncer de cérvix.** El astemizol (A) inhibe la actividad metabólica en diversas líneas celulares de cáncer de cérvix: SiHa, HeLa y Ca Ski a una concentración de 5  $\mu$ M y de manera significativa en comparación al vehículo (V). La actividad metabólica es proporcional a la proliferación celular. (Adaptado de Chávez-López *et. al.*, 2014).

El astemizol por si solo constituye una opción terapéutica prometedora para el cáncer de cérvix al disminuir la actividad metabólica (proliferación) y aumentar la apoptosis celular la cual se midió por citometria de flujo. No obstante, la combinación con otro antineoplásico que tenga un efecto prometedor en estas células por una vía diferente, como el bloqueo de los EGFR, podría ser la clave para tener una terapia combinada efectiva contra este tipo de cáncer. El gefitinib podría ser una buena opción, debido a los efectos antineoplásicos en distintos tipos de cáncer y a que es un fármaco que ya se encuentra en la clínica.

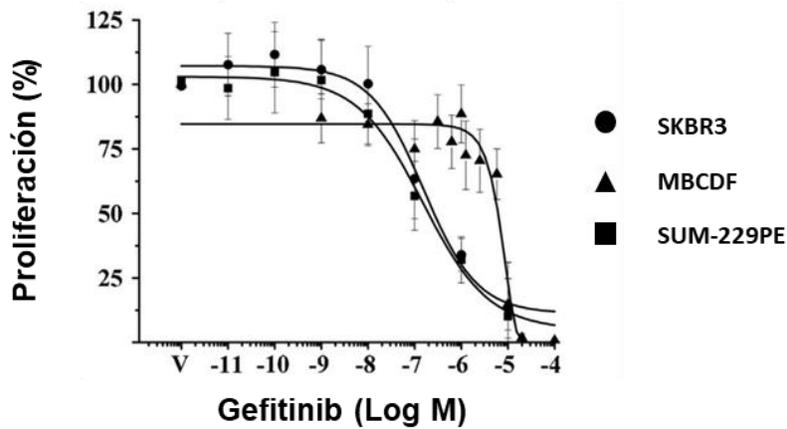
### 1.9.- Gefitinib como antineoplásico en diferentes tipos de cáncer

El gefitinib es un medicamento para tratar el cáncer de pulmón no microcítico en etapas avanzadas. No es utilizado en etapas tempranas ya que genera resistencia por las mutaciones antes mencionadas, lo cual no se considera un tratamiento de primera elección. El efecto antineoplásico del gefitinib también se ha evaluado en otros tipos de cáncer, como es el caso de cáncer de páncreas y de mama. En un estudio *in vitro* llevado a cabo por Xiaohua y colaboradores se demostraron que el gefitinib inhibe la proliferación de las líneas celulares de cáncer de páncreas PANC-1 y CFPANC-1 como se muestra en la figura 5 (Xiaohua *et. al.*, 2009).



**Figura 5. El Gefitinib inhibe la proliferación en células de cáncer de páncreas.** El Gefitinib inhibe el crecimiento en líneas celulares de cáncer de páncreas (PANC-1 y CFPANC-1) de manera significativa y dependiente a la concentración (Xiaohua *et. al.*, 2009).

Por otra parte, Segovia-Mendoza y colaboradores también observaron que el gefitinib inhibe la proliferación de diversas líneas celulares de cáncer de mama de una manera dependiente de la concentración (Segovia-Mendoza *et. al.*, 2015).



**Figura 6. El Gefitinib inhibe la proliferación en células de cáncer de mama.** El Gefitinib inhibe el crecimiento en líneas celulares de cáncer de mama (SKBR3, MBCDF y SUM-229PE) de manera significativa y dependiente a la concentración (Segovia-Mendoza *et. al.*, 2015).

Además del efecto del gefitinib en otros tipos de cáncer a nivel *in vitro*, su efecto también ha sido evaluado *in vivo* mostrando efectos prometedores (Tabla 1).

**Tabla 1. Gefitinib como antineoplásico en cáncer de mama, cérvix e hígado.**

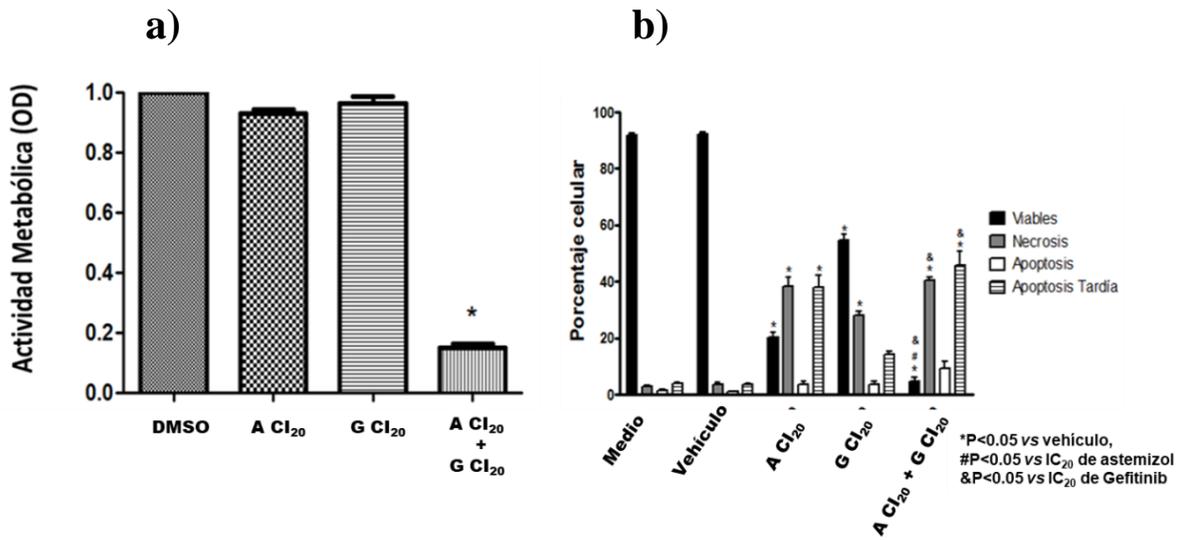
Tipo de cáncer	Tipo de estudio	Modelo de estudio	Concentración o dosis	Efecto	Referencia
<b>Mama</b>	<i>In vitro</i>	SUM-229PE SKBR3 MBCDF	$1*10^{-11}$ a $1*10^{-4}$ M	Inhibe la proliferación	Segovia-Mendoza <i>et. al.</i> , 2015
<b>Mama</b>	Clínico (Fase II)	Pacientes	Gefitinib Fulvestran Anastrozol	Terapia neo adyuvante efectiva, reduce proliferación en tumores RE+	Massarweh <i>et. al.</i> , 2011
<b>Cérvix</b>	Clínico (Fase II)	Pacientes	250 mg/día	Control efectivo de la enfermedad y disminuye la metástasis	Sharma <i>et. al.</i> , 2013
<b>Hígado</b>	<i>In vivo</i>	Ratones	100mg/kg Gefitinib 1 mg/kg Irinotecan	Disminuye el crecimiento tumoral en un 45%	Shao <i>et. al.</i> , 2016

En la tabla se muestra el efecto antineoplásico del Gefitinib en líneas celulares y/o pacientes con cáncer de mama, cérvix e hígado. La administración de Gefitinib también mejora el pronóstico de los pacientes (Segovia-Mendoza *et. al.*, 2015, Nicholson *et. al.*, 2002, Sharma *et. al.*, 2013, Zhu *et. al.*, 2005, Shao *et. al.*, 2016).

Estos diferentes estudios nos han llevado a pensar que una terapia combinada de astemizol con gefitinib podría ser la respuesta para disminuir las dosis de este inhibidor del EGFR, evitar la resistencia que genera y potenciar su efecto como un antineoplásico.

### **1.10.- Efecto del astemizol y gefitinib en una terapia combinada en la línea celular de cáncer de pulmón A549**

Los efectos por separado del astemizol y del gefitinib en líneas celulares de diferentes tipos de cáncer y su efecto en ratones llevaron a nuestro grupo de trabajo a evaluar la terapia combinada de estos fármacos en la proliferación de las células de cáncer de pulmón A549. Los resultados mostraron que si bien a las respectivas  $CI_{20}$  de los fármacos por separado no hay ningún efecto en la proliferación celular, al combinar ambos fármacos disminuye considerablemente la proliferación de forma significativa (figura 7 panel a), además en ensayos de apoptosis se puede observar una disminución en las células viables en comparación de las  $CI_{20}$  por separado (Figura 7 panel b) (Chávez-López *et. al.*, Manuscrito en preparación).



**Figura 7. Efecto de la combinación astemizol-gefitinib en la proliferación celular y apoptosis de las células de cáncer de pulmón A549.** a) El astemizol (A) y gefitinib (G) a sus respectivas CI<sub>20</sub> no inhibieron la actividad metabólica de las células A549; no obstante, la combinación de ambos compuestos tiene efecto significativo. b) El astemizol y gefitinib promueven apoptosis en la línea celular A549 a sus respectivas CI<sub>20</sub> y al combinarlos disminuyen el número de células viables (Chávez-López *et. al.*, Manuscrito en preparación).

Con base en lo anterior la terapia combinada de astemizol y gefitinib, puede tener efectos antineoplásicos prometedores en aquellos tipos de cáncer que sobre expresen a sus blancos moleculares, como es el caso del cáncer de cérvix.

## **II.- JUSTIFICACIÓN**

A pesar de que se cuenta con intervenciones efectivas para la detección oportuna del cáncer cervicouterino la relación mortalidad/incidencia en esta neoplasia aún es elevada, por lo que es necesario desarrollar nuevas estrategias de tratamiento.

El efecto por separado del astemizol y del gefitinib en diversos tipos de cáncer y su efecto combinado en células de cáncer de pulmón, permiten pensar en el potencial de esta combinación como alternativa terapéutica en cánceres que expresen los blancos moleculares de dichos fármacos, como es el caso del cáncer de cérvix.

### **III.- HIPÓTESIS**

La terapia combinada de astemizol-gefitinib en líneas celulares de cáncer de cérvix tendrá un efecto sinérgico en la inhibición de la proliferación y la expresión génica de EAG1 en comparación con la monoterapia.

## **IV.- OBJETIVOS**

### **4.1.- Objetivo general**

Evaluar la efectividad del tratamiento combinado de astemizol-gefitinib en la inhibición de la proliferación y expresión génica de EAG1 en líneas celulares de cáncer de cérvix.

### **4.2.- Objetivos específicos**

- Determinar la expresión proteica de EAG1 y EGFR en células de cáncer de cérvix
- Evaluar el efecto del astemizol y del gefitinib en la proliferación de las líneas celulares
- Determinar las concentraciones inhibitorias al 20% (CI<sub>20</sub>) y al 50% (CI<sub>50</sub>) de cada compuesto
- Realizar los estudios de combinación astemizol-gefitinib y determinar si el efecto es sinérgico, aditivo o antagónico
- Determinar el efecto del astemizol y/o gefitinib en la expresión de EAG1

## V.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1.- Reactivos

Los medios de cultivo, suero fetal de bovino (SFB), Trizol® y los oligonucleótidos para la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) fueron adquiridos de Invitrogen (CA, EUA). Las sondas moleculares, placas, sistema de retrotranscripción (RT) y el estuche para evaluar la proliferación celular fueron de Roche (Roche Applied Science, IN, EUA). El gefitinib y el astemizol fueron obtenidos de Sigma Aldrich (St. Louis MO, EUA).

### 5.2.- Cultivo celular

Se utilizaron las líneas celulares de cáncer de cérvix HeLa y SiHa. Las células se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml estreptomicina y 5% de SFB inactivado. Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo en medio DMEM-F12 suplementado con 5% de SFB inactivado y tratado con carbón-dextrán. El mantenimiento celular así como los procedimientos experimentales se llevaron a cabo a 37 °C bajo atmósfera húmeda, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire.

### 5.3.- Inmunocitoquímica (ICQ)

Las células se cultivaron en laminillas electrocargadas para cultivo celular (Thermo Scientific Nunc, 177380) y se fijaron en etanol al 96% para su caracterización. La recuperación antigénica se realizó en EDTA *decloaker* (Biocare Medical). Las laminillas se trataron por 5 minutos con bloqueador de peroxidasa *immunodetector* (BioSB). Para EAG1 un bloqueo adicional de 5 minutos se llevó usando *background sniper* (Biocare Medical). Con la finalidad de caracterizar las células, las laminillas se incubaron en presencia de los siguientes anticuerpos: EGFR (1:200/1 hora, BioSB) y EAG1 (1:300/2 horas, Novus Biologicals). Posteriormente, las laminillas se incubaron con *Immuno Detector Biotin Link* e *Immuno Detector HRP* (BioSB) durante 10 minutos. La diaminobencidina y la hematoxilina se usaron para revelar y contrateñir, respectivamente. Después de la incubación de cada reactivo, las laminillas se lavaron por 2 minutos con TBS.

#### **5.4.- Estudios de Proliferación**

Las células se sembraron en placas de 96 pozos a razón de 1000 células por pozo, 24 horas después se adicionó el medio conteniendo el vehículo, el astemizol, el gefitinib o la combinación de ambos por sextuplicado y se incubaron durante 6 días. Al cabo de este tiempo, se evaluó la proliferación celular mediante el ensayo colorimétrico basado en XTT (Sal sódica de la 2, 3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2*H*-tetrazolio-5-carboxanilida), siguiendo las indicaciones del fabricante. La sal de tetrazolio, XTT, se usa para determinar cuantitativamente la proliferación de las células metabólicamente activas. El ensayo se basa en la escisión del anillo de tetrazolio del XTT (de color amarillo) por la deshidrogenasa mitocondrial y el reactivo acoplador de electrones PMS (*N*-metildibenzopirazina metil sulfato) para formar la sal de formazán (de color naranja), la cual es soluble en solución acuosa y se cuantifica por absorbancia mediante un espectrofotómetro. Para estos experimentos, la absorbancia se determinó en un espectrofotómetro Multiskan (Labsystems Inc., Canada) a 492 nm. Los valores de absorbancia se normalizaron con respecto al vehículo, al cual se le dio arbitrariamente el valor de 100.

#### **5.5.- Determinación de las concentraciones inhibitorias (CI) y del índice de combinación (IC)**

Las CI se calcularon a partir de las curvas de concentración-respuesta de cada compuesto por el análisis de regresión logística no lineal utilizando el programa Origin (OriginLab Corporation, Northampton, MA). La  $CI_{50}$  se consideró como la concentración necesaria de cada compuesto para inhibir el 50% de la proliferación celular con respecto al máximo y mínimo efecto, dentro del intervalo de concentraciones probadas (astemizol: 0.5 – 8  $\mu$ M; gefitinib: 0.0001 a 20  $\mu$ M). Por otro lado, el IC entre los fármacos se determinó con la fórmula descrita por Chou-Talalay (Fórmula 1), la cual indica que si el valor es  $< 1$ ,  $= 1$  ó  $> 1$ , el efecto al coincubar dos o más fármacos es de tipo sinérgico, aditivo o antagónico, respectivamente (Chou, 2006).

$$IC = \frac{(D)_1}{(Dm)_1 (fa/1-fa)^{1/m1}} + \frac{(D)_2}{(Dm)_2 (fa/1-fa)^{1/m2}}$$

**Fórmula 1: Determinación del índice de combinación.** (D)<sub>1</sub>=concentración utilizada del fármaco 1; (D)<sub>2</sub>=concentración utilizada del fármaco 2; (Dm)<sub>1</sub>=concentración inhibitoria al 50% del fármaco 1; (Dm)<sub>2</sub>=concentración inhibitoria al 50% del fármaco 2; fa=fracción afectada de la proliferación celular cuando se coincuban los dos fármacos (Fa=1-(valor de absorbancia normalizado/100)); m1=pendiente obtenida con la curva de concentración respuesta del fármaco 1; m2=pendiente obtenida con la curva de concentración respuesta del fármaco 2 (Chou, 2010).

## 5.6.- Estudios de expresión génica

Las células se cultivaron en presencia de las CI<sub>50</sub> de astemizol y/o gefitinib o su vehículo durante 24 horas. Al cabo de este tiempo, se aspiró el medio y se extrajo el RNA utilizando Trizol®. Dos µg de RNA se utilizaron para la reacción de retrotranscripción. La qPCR se llevó a cabo en el equipo LightCycler® 480 de Roche (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) de acuerdo al siguiente protocolo: activación de la Taq DNA polimerasa a 95 °C x 10 minutos, seguido de 45 ciclos de amplificación de 95 °C x 10 segundos, 60 °C x 30 segundos y 72 °C x 1 segundo. La expresión relativa del RNAm de EAG1 se normalizó *versus* la expresión del gen de la proteína ribosomal 60S L32 (L32). Las secuencias de los oligonucleótidos así como las sondas utilizadas se describen en la Tabla 2. Los valores de vehículo se llevaron arbitrariamente a 1.

**Tabla 2. Sondas y oligonucleótidos utilizados.**

Gen	Sentido	Antisentido	No. sonda*
EAG1	CCTGGAGGTGATCC	CATCTCCAACAC	49
	AAGATG	GTCTCCTT	
RPL32	GAAGTTCCTGGTCC	GAGCGATCTCGG	17
	ACAACG	CACAGTA	

\*De la biblioteca Universal Roche. Secuencias proporcionadas por UNIPARTS, S.A.

### **5.6.- Análisis estadístico**

La diferencia significativa ( $P < 0.001$ ) se determinó con los datos del promedio  $\pm$  desviación estándar (D.E.) mediante ANOVA de una vía seguido de un *post hoc* de Holm-Sidak utilizando el programa SigmaStat (Jandel Scientific).

## VI.- RESULTADOS

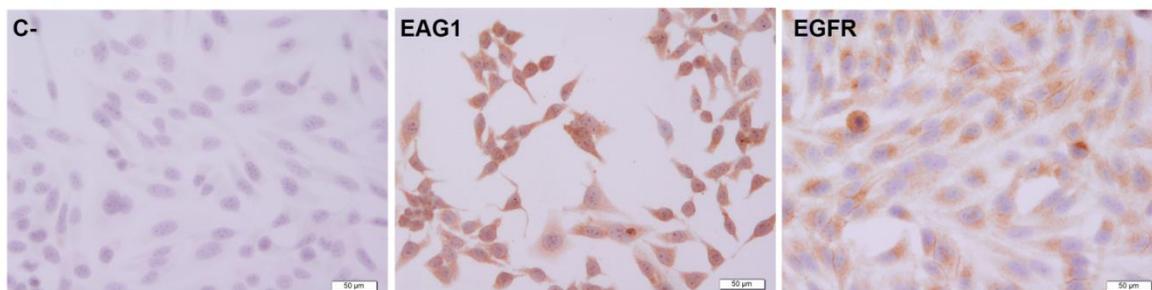
### 6.1.- Caracterización de las líneas celulares utilizadas

Para este estudio, se utilizaron dos líneas celulares establecidas de cáncer de cérvix (HeLa y SiHa con VPH), mismas que se caracterizaron por ICQ para nuestros blancos de interés (Tabla 3, Figura 8).

**Tabla 3. Caracterización celular.**

Línea Celular	EAG1	EGFR
HeLa	+	+
SiHa	+*	+*

En la tabla se muestra la expresión (+) del canal EAG1 y de EGFR en las líneas celulares de cáncer de cérvix HeLa y SiHa. Con base en la literatura y en estudios previos del grupo de trabajo estas líneas celulares expresan ambos blancos moleculares. \* Para estas células no se evaluó la expresión por inmunocitoquímica, solo por qPCR.

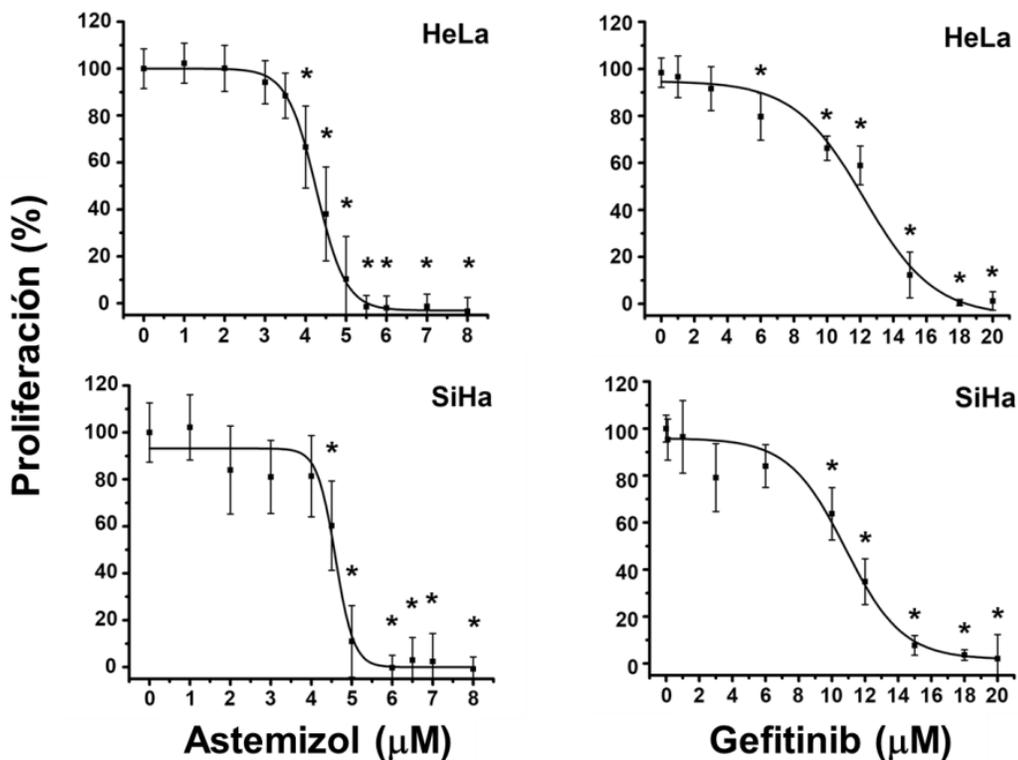


**Figura 8. Inmunocitoquímica de EAG1 y EGFR.** Microfotografías representativas de la expresión del canal de potasio eter à-go-go (EAG1) y del receptor al factor de crecimiento epidérmico humano tipo 1 (EGFR) en color café en las células HeLa. C-: células incubadas en ausencia del anticuerpo primario, EAG1: células incubadas en presencia del anticuerpo primario anti-EAG1 y EGFR: células incubadas en presencia del anticuerpo primario anti-EGFR.

Una vez corroborada la presencia de EAG1 y EGFR se evaluaron los efectos del astemizol y/o gefitinib en la proliferación celular.

## 6.2.- Efectos antiproliferativos del gefitinib y del astemizol en las células de cáncer de cérvix

Los efectos antiproliferativos del astemizol y del gefitinib se determinaron en las células ya descritas, con la finalidad de caracterizar su capacidad para inhibir el crecimiento y definir las concentraciones inhibitorias (CI). Para ambos fármacos se observó un efecto antiproliferativo significativo y dependiente de la concentración, en ambas líneas celulares (Figura 9).



**Figura 9.** Efectos antiproliferativos del astemizol y del gefitinib en células de cáncer de cérvix. Las células se cultivaron en presencia de diferentes concentraciones de astemizol (0.5 – 8 µM) o gefitinib (0.0001 – 20 µM) durante 6 días. Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  D.E. de sextuplicados y representan al menos 3 diferentes experimentos. \* indica diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) vs el control.

Con base en los estudios de concentración-respuesta se calcularon los valores de  $CI_{20}$  y  $CI_{50}$ , mismos que se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4. Concentraciones inhibitorias (CI) del astemizol y del gefitinib en las líneas celulares.**

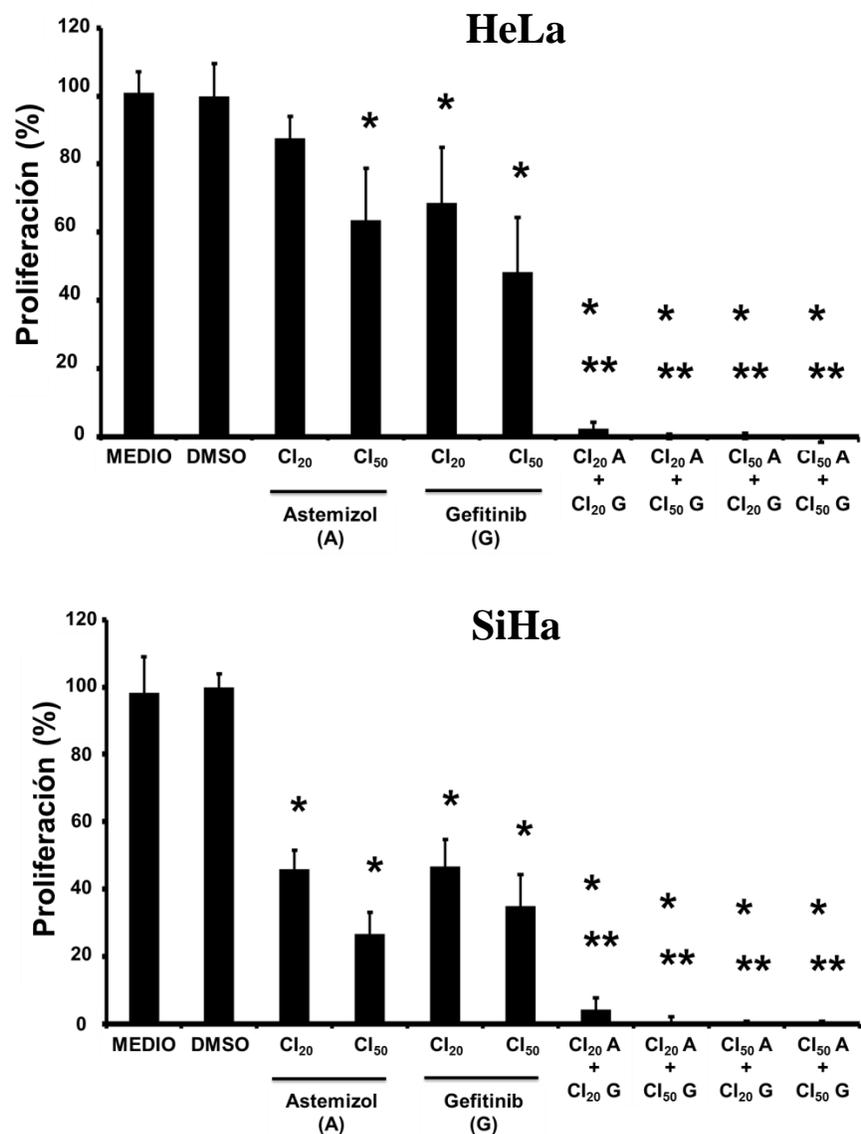
Línea celular	Astemizol ( $\mu\text{M}$ )		Gefitinib ( $\mu\text{M}$ )	
	CI <sub>20</sub>	CI <sub>50</sub>	CI <sub>20</sub>	CI <sub>50</sub>
<b>HeLa</b>	3.76	4.26	9.30	12.23
<b>SiHa</b>	4.28	4.59	8.44	10.82

En la tabla se muestran los valores de las concentraciones al 20% (CI<sub>20</sub>) y al 50% (CI<sub>50</sub>) del astemizol y gefitinib.

En los estudios de combinación de fármacos es recomendable probar las CI<sub>50</sub>, y concentraciones menores por debajo de éstas, con el objetivo de visualizar mejor el efecto en conjunto. Con base en lo anterior, se establecieron esquemas de combinación entre las CI<sub>20</sub> y CI<sub>50</sub> de cada fármaco, para evaluar el efecto en la proliferación celular (Chou, 2010).

### **6.3.- Efecto de la combinación gefitinib y astemizol en la proliferación celular**

Los efectos en conjunto se expresaron como el porcentaje de la inhibición de la proliferación celular. En la Figura 10 se muestran los efectos ejercidos por astemizol y gefitinib a sus respectivas CI<sub>20</sub>, CI<sub>50</sub> y los siguientes esquemas de combinación: CI<sub>20</sub>+CI<sub>20</sub>, CI<sub>20</sub>+CI<sub>50</sub>, CI<sub>50</sub>+CI<sub>20</sub> y CI<sub>50</sub>+CI<sub>50</sub>. Como se observa, el porcentaje de inhibición de la proliferación celular cuando se coincubaron con ambos fármacos a sus respectivas CI<sub>20</sub> fue mayor al 90% en ambas líneas celulares e interesantemente en el resto de los esquemas de combinación la inhibición fue del 100%.



**Figura 10. Efectos antiproliferativos ejercidos por el astemizol (A) y el gefitinib (G) *per se* y en combinación en células de cáncer de cérvix.** Las combinaciones se probaron en ambas líneas celulares, HeLa (panel superior) y SiHa (panel inferior). Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  D.E. de sextuplicados y representan al menos 3 diferentes experimentos. \*  $P < 0.001$  vs DMSO, \*\* $P < 0.001$  vs monoterapia.

Como se observa en la Figura 10, el gefitinib y el astemizol por si solos disminuyeron de forma significativa la proliferación de HeLa y SiHa cuando se usaron las CI<sub>20</sub> y CI<sub>50</sub>, con excepción de la CI<sub>20</sub> de astemizol en HeLa, pero cuando se utilizaron concomitantemente se inhibió significativamente el crecimiento celular en comparación a la monoterapia. Los resultados anteriores muestran que el efecto en conjunto de astemizol y el gefitinib para inhibir el crecimiento celular es mayor con respecto al efecto por separado de cada

compuesto. Sin embargo, el definir matemáticamente el tipo de interacción farmacológica (sinérgico, aditivo o antagónico) mediante el cálculo del IC, fue necesario.

#### 6.4.- Cálculo del índice de combinación (IC)

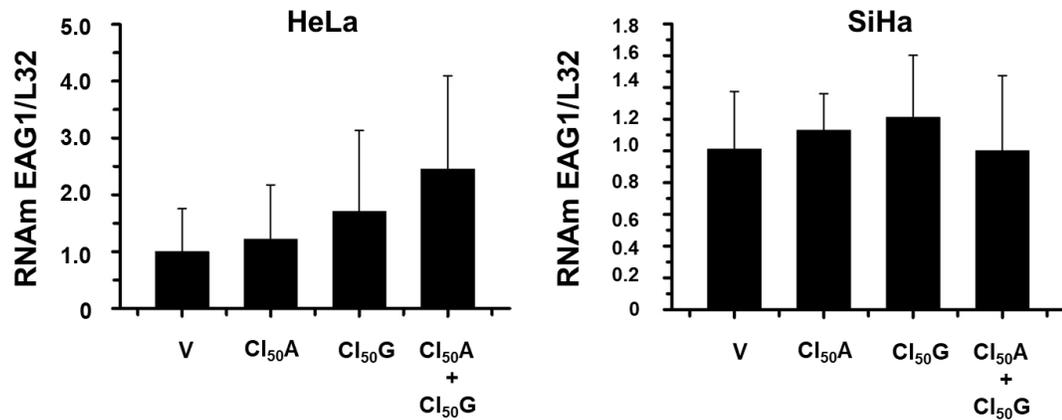
El IC se calculó mediante el algoritmo de Chou-Talalay. Los valores del IC se calcularon con todas las combinaciones antes descritas de astemizol y gefitinib para cada línea celular. Al aplicar el algoritmo, los resultados mostraron que el IC fue  $< 1$  en todos los casos, lo cual indica que la interacción entre ambos fármacos fue de tipo sinérgica (Tabla 5).

**Tabla 5. Valores del índice de combinación (IC).**

Línea celular	Combinaciones de astemizol (A) y gefitinib (G)	IC	Interpretación
HeLa	CI <sub>20</sub> A+CI <sub>20</sub> G	0.039	Sinergismo muy fuerte
	CI <sub>20</sub> A+CI <sub>50</sub> G	0.007	Sinergismo muy fuerte
	CI <sub>50</sub> A+CI <sub>20</sub> G	0.002	Sinergismo muy fuerte
	CI <sub>50</sub> A+CI <sub>50</sub> G	0.012	Sinergismo muy fuerte
SiHa	CI <sub>20</sub> A+CI <sub>20</sub> G	0.185	Sinergismo fuerte
	CI <sub>20</sub> A+CI <sub>50</sub> G	0.076	Sinergismo muy fuerte
	CI <sub>50</sub> A+CI <sub>20</sub> G	0.052	Sinergismo muy fuerte
	CI <sub>50</sub> A+CI <sub>50</sub> G	0.041	Sinergismo muy fuerte

#### 6.5.- Efecto del astemizol y/o gefitinib en la expresión de EAG1

El astemizol y gefitinib *per se* o en combinación a sus respectivas CI<sub>50</sub> no modificó la expresión génica de EAG1 (Figura 11).



**Figura 11. Efecto de la combinación astemizol-gefitinib en la expresión génica de EAG1.** La expresión génica de EAG1 fue evaluada a las respectivas concentraciones inhibitorias 50 (CI<sub>50</sub>) de astemizol (A), gefitinib (G) o la combinación de estos compuestos. La expresión génica de EAG1 no se modificó con los tratamientos y se normalizó con respecto al vehículo (V) al cual se le dio arbitrariamente el valor de 1. Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  D.E. de triplicados y representan 3 diferentes experimentos.

## VII.- DISCUSIÓN

En el presente trabajo, las líneas celulares mostraron expresión de EGFR y EAG1 independientemente de la expresión de otros receptores celulares o de las proteínas de VPH. Tanto el gefitinib como el astemizol por si solos inhibieron la proliferación celular, siendo la sensibilidad a estos fármacos diferente en cada una de las líneas celulares utilizadas.

Los valores de  $CI_{20}$  y  $CI_{50}$  de astemizol y gefitinib fueron menores a las concentraciones tóxicas en suero reportadas para cada compuesto, astemizol: 30  $\mu M$ ; gefitinib: no se tiene una concentración tóxica reportada (Adamantidis *et. al.*, 1995). La agencia Europea de Medicamentos reporta que con dosis diarias de hasta 1000 mg, 4 veces la dosis recomendada, han demostrado tener efectos adversos en piel pero la suspensión del medicamento por 14 días es suficiente para regresar a la normalidad (<http://www.ema.europa.eu/ema/> Fecha de búsqueda: 09 de octubre de 2017). En este estudio el efecto sinérgico entre el gefitinib y el astemizol se observó a concentraciones de aproximadamente 4  $\mu M$  que es considerablemente menor a la concentración tóxica reportada de 30  $\mu M$  (Adamantidis *et. al.*, 1995). El efecto sinérgico entre el astemizol y el gefitinib se observó desde las combinaciones con las  $CI_{20}$ , lo que indica que ambos fármacos podrían ser usados a dosis menores a las que actualmente se utilizan por separado (Tabla 6).

**Tabla 6. Concentraciones terapéuticas y tóxicas de astemizol.**

Concentraciones de Astemizol	( $\mu M$ )
Terapéuticas como antihistamínico (10 mg/día)	Se alcanzan niveles máximos en suero de 0.10
Tóxicas en suero	30
$CI_{20}$ promedio en este estudio	4.02

La expresión de las proteínas blanco es de vital importancia para el efecto de la terapia farmacéutica, el epitelio superficial del cérvix rara vez muestra expresión de EGFR mientras que en el cáncer cervicouterino la expresión de este receptor se encuentra hasta en un 90%

de los casos. La expresión de EGFR parece tener una asociación directa con la infección por VPH, como lo demuestra su creciente expresión mientras aumenta el grado de la NIC. La expresión de HER 2 en tejido cervical sano también es casi nula y su expresión en cáncer de cérvix es de apenas un 22%, sin embargo, se ha observado que su expresión aumenta en pacientes que responden a la quimioterapia. En un estudio con 78 pacientes con neoplasia cervical se detectó una sobreexpresión de HER 3 en el 74.4% de los casos, la sobreexpresión de HER 3 se ha relacionado con mal pronóstico (Reyes *et. al.*, 2014).

El gefitinib es un inhibidor de la tirosina cinasa del EGFR muy específico pero también tiene efecto sobre HER2 (Receptor para factor de crecimiento tipo 2), estudios en pacientes con cáncer de mama administrando dosis de 250 mg/día demostraron tener efecto en HER2 inhibiendo su activación, además también se observó que evita la formación de dímeros en HER3 (Receptor para factor de crecimiento tipo 3), ya que se une a p85 $\alpha$  la subunidad reguladora de PI3K, lo cual evita su activación con otros HER3 u otros receptores de la familia (Segovia-Mendoza *et. al.*, 2015). Estos estudios han descrito que bajo una dosis de 250 mg/día de gefitinib tiene un efecto inhibitorio para cada uno de los blancos antes mencionados en ese orden. El astemizol tiene un efecto inhibitorio en los transportadores ABC, los cuales son los transportadores que se encargan de expulsar el gefitinib del interior de la célula, esto puede ocasionar que las concentraciones de gefitinib en el interior de la célula aumenten de forma dependiente del astemizol ocasionando que el gefitinib tenga acción sobre HER2 y HER3.

Con base a lo anterior se puede ofrecer una explicación tentativa del efecto que tuvo el gefitinib en este estudio, si bien su especificidad se enfoca en el EGFR se ha observado que también tiene efecto sobre HER 2 y HER 3, al tener mayor disponibilidad intracelular del gefitinib su efecto sobre HER 2 y HER 3 puede ser mayor, mejorando el pronóstico del tratamiento y disminuyendo la proliferación celular en las líneas celulares de cáncer de cervix.

Los miembros de la familia Erbb representan objetivos terapéuticos de gran importancia en el cáncer de cérvix, los resultados que se observan en este ensayo nos permiten pensar que las terapias combinadas entre inhibidores de la familia HER y otros fármacos antineoplásicos pueden ser una opción eficaz para atacar el cáncer.

Los canales EAG1 tienen una nula expresión en tejido cervical sano mientras que en un 100% de muestras cancerosas se encuentra expresado, esto lo convierte en un blanco muy específico para tumores cervicales (Farias *et. al.*, 2004). La inhibición de este canal está relacionada en neoplasias con la disminución en la proliferación celular y el volumen tumoral (Pardo and Stühmer, 2008).

Sachiko y colaboradores demostraron que en presencia de histamina las células HeLa presentan variaciones en las corrientes de calcio las cuales generan cadenas de señalización que favorecen el crecimiento celular. Estas corrientes de calcio por lo general son activadas por estimulación de un receptor acoplado a proteína G como los receptores de histamina de tipo 1 (Sachiko *et. al.*, 2014).

En este ensayo se observó que el astemizol, un inhibidor no específico de EAG1, disminuye la proliferación de forma dependiente de la concentración en dos líneas celulares de cáncer de cérvix. Su efecto puede estar relacionado tanto en la inhibición del EAG1 como en el bloqueo de los receptores de histamina de tipo 1 lo cual evitaría las corrientes de calcio que llevan a crecimiento celular. Estos resultados demuestran que el astemizol tiene que ser considerado como una opción terapéutica para el cáncer de cérvix y otros tipos de cáncer que expresen EAG1.

El astemizol, además, de bloquear la corriente a través de EAG1 también tiene otros blancos: bloquea canales de potasio rectificadores tardíos (IKr), el canal de potasio Erg y los receptores de histamina tipo 1. El canal de potasio Erg tiene participación en la proliferación de células cancerígenas, por lo que su inhibición está relacionada con la caída en la proliferación. Sin embargo la inhibición de este canal puede llevar a problemas relacionados con arritmias cardiacas, síndrome de QT largo y muerte súbita que es la principal razón por la que se retiró del mercado Europeo. Pero cabe aclarar que la mayoría de estos efectos negativos se presentan a dosis de 200 mg/día, 20 veces mayor a la dosis recomendada, interacción farmacológica con fármacos que inhiben su catabolismo y pacientes con enfermedades cardiacas o hepáticas (García-Quiroz and Camacho, 2011).

El tratamiento concomitante de astemizol con gefitinib, disminuyó sinérgicamente la proliferación celular independientemente de la línea celular. Sin embargo no tuvo ningún efecto en la expresión de EAG1 lo cual nos hace pensar en cuál será la forma en la que se

relacionan los tratamientos para inhibir la proliferación de forma sinérgica. Un estudio muy interesante demostró por primera vez que el canal EAG1 está regulado por la cinasa de EGFR en los residuos de tirosina 90, 344 y 485, este efecto se ve involucrado en el sistema nervioso central y en el crecimiento tumoral (Wei Wu *et. al.*, 2012). De acuerdo a lo anterior si se agrega un inhibidor de la tirosina cinasa del EGFR como el gefitinib se disminuye la activación del canal EAG1 por otra vía además de la inhibición causada por el astemizol.

A continuación se resume un posible mecanismo del efecto sinérgico de la combinación utilizada: El efecto del astemizol en el canal EAG1 y los receptores a histamina de tipo 1 disminuyen la proliferación y el crecimiento celular. La inhibición de EGFR, HER 2 y HER 3 por gefitinib reduce la proliferación. La combinación de los fármacos ocasiona una inhibición del canal EAG1, causada por el bloqueo del gefitinib en EGFR, el bloqueo de los transportadores ABC por parte del astemizol aumentando las concentraciones intracelulares de gefitinib en la célula lo que a su vez aumenta el efecto del gefitinib sobre HER 2 y HER 3. El conjunto de todos estos factores nos aclaran un poco los mecanismos por los cuales se sinergiza el efecto antiproliferativo en las líneas celulares de cáncer de cérvix.

## **VIII.- CONCLUSIONES**

La administración concomitante del astemizol y el gefitinib inhibió de manera sinérgica la proliferación en las líneas celulares de cáncer cervicouterino.

Estos resultados proporcionan bases científicas para llevar a cabo estudios *in vivo* diseñados para probar ambos compuestos a bajas dosis manteniendo el efecto antineoplásico y con menos efectos secundarios.

Lo aquí descrito ofrece una alternativa plausible y aplicable a aquellos tipos de cáncer que coexpresen EAG1 y EGFR.

## **IX.- PERSPECTIVAS**

Utilizando este ensayo como base, se debe llevar la experimentación de la terapia combinada de astemizol-gefitinib a estudios en animales para poder observar su efectividad en un organismo complejo y en un ambiente tumoral más cercano a la realidad.

Tomando en cuenta la dosis del astemizol como antihistamínico, es necesario llevar a cabo ensayos clínicos de fase II para determinar la máxima dosis tolerada de astemizol en pacientes con cáncer y a la vez determinar la dosis como antineoplásico.

Evaluar el efecto de la terapia combinada de astemizol-gefitinib en otros tipos de cáncer que también expresen estos biomarcadores, como mama, ya que en este tipo de tumores el EAG1 y el EGFR se encuentran altamente expresados.

Determinar el mecanismo por el cual se sinergiza el efecto antiproliferativo del astemizol y el gefitinib al combinarse.

### XIII.- REFERENCIAS

- Adamantidis MM. *et. al.*, **Electrophysiological and arrhythmogenic effects of the histamine type 1-receptor antagonist astemizole on rabbit Purkinje fibers: clinical relevance.** J Cardiovascular Pharmacology. 26 (1995): 319-327.
- Camacho J. **Ether a go-go potassium channels and cancer.** Cancer Letters. 233 (2006):1-9.
- Carreón OZ *et. al.*, **The epidermal growth factor receptor (EGFR) and its relationship with cáncer.** Vertientes. 15 (2012): 15-25.
- Cetina L *et. al.*, **Brachytherapy versus radical hysterectomy after external beam chemoradiation: a non-randomized matched comparison in IB2-IIB cervical cancer patients.** World Journal of Surgical Oncology. 7 (2009): 19.
- Chavaro V *et. al.*, **Cáncer cervicouterino.** Anales de Radiología México. 1 (2009): 61-79.
- Chávez-López MG *et. al.*, **Antiproliferative and proapoptotic effects of Astemizole on Cervical Cancer Cells.** International Journal of Gynecological Cancer. 24 (2014): 824-828.
- Chávez-López MG *et. al.*, **Astemizole-based anticancer therapy for hepatocellular carcinoma (HCC), and Eag1 channels as potential early-stage markers of HCC.** Tumor Biology. 36 (2015): 6149-6158.
- Chen Y. *et. al.*, **Functional KV10.1 Channels Localize to the Inner Nuclear Membrane.** PLoS ONE. 6 (2011): 1-15.
- Chou TC. **Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method.** Cancer Letters. 15 (2010): 440-446.
- Dueñas-González A *et. al.*, **Pharmacotherapy options for locally advanced and advanced cervical cancer.** Drugs. 70 (2010): 403-432.
- Farías LM *et. al.*, **Ether a go-go potassium channels as human cervical cancer markers.** Cancer Research. 64 (2004):6996-7001.
- García-Ferreiro R *et. al.*, **Mechanism of block of hEag1 K<sup>+</sup> channels by imipramine and astemizole.** J. of Gen. Physiology. 124 (2004): 301-317.
- García-Quiroz J and Camacho J, **Astemizole: an old anti-histamine as a new promising anti-cancer drug.** Anticancer Agents in Medicinal Chemistry. 11(2011):307-314.
- García-Quiroz J *et. al.*, **Astemizole synergizes calcitriol antiproliferative activity by inhibiting CYP24A1 and upregulating VDR: A novel approach for breast cancer therapy.** PLoS ONE 7 (2012).
- Gazdar AF, **Personalized medicine and inhibition of EGFR signaling in lung cancer.** The New England Journal of Medicine. 10 (2009): 1018-1020.
- GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence worldwide. <http://globocan.iarc.fr> (fecha de acceso: 27/02/2017).

Hemmerlein B *et. al.*, **Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours.** *Molecular Cancer*. 5 (2006):1-13.

Jiménez L. F, Merchant H: **Biología Celular y Molecular**, Pearson Educación, Primera edición, cap 21, 2003

Díaz L. *et. al.*, **Estrogens and Human Papilloma Virus Oncogenes Regulate Human Ether-a`-go-go-1 Potassium Channel Expression.** *Cancer Research*. 69 (2009): 3300-3307.

Ouadid-Ahidouch. *et. al.*, **Functional and molecular identification of intermediate-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels in breast cancer cells: association with cell cycle progression.** *Cell Physiology*. 1 (2004): 125-134.

Pardo LA and Stühmer W, **Eag1 as a cancer target.** *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 12 (2008):837-843.

Pardo LA and Stühmer W, **The roles of K<sup>+</sup> channels in cancer.** *Nature Reviews*. 14 (2013): 39-48.

Peralta-Zaragoza *et. al.*, **Targeted treatments for cervical cancer: a review.** *OncoTargets and Therapy*. 5 (2012): 315-328.

Reyes H. D. *et. al.*, **Comprehensive Profiling of EGFR/HER Receptors for Personalized Treatment of Gynecologic Cancers.** *National Institutes of Health*. 18 (2014): 137-151.

Rodríguez-Rasgado JA. *et. al.*, **Eag1 channels as potential cancer biomarkers.** *Sensors*. 12 (2012): 5986-5995.

Richart RM, **A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia.** *Obstetrics & Gynecology*. 75 (1990): 131-133.

Sachiko Ishida *et. al.*, **Phospholipase C- $\beta$ 1 and  $\beta$ 4 Contribute to Non-Genetic Cell-to-Cell Variability in Histamine-Induced Calcium Signals in HeLa Cells.** *PLoS ONE* 9 (2014): 1–12.

Segovia-Mendoza M *et. al.*, **Efficacy and mechanism of action of the tyrosine kinase inhibitors gefitinib, lapatinib and neratinib in the treatment of HER2-positive breast cancer: preclinical and clinical evidence.** *Cancer Research*. 5 (2015): 2531–2561.

Segovia-Mendoza M *et. al.*, **Calcitriol and its analogues enhance the antiproliferative activity of gefitinib in breast cancer cells.** *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 148 (2015): 122–131.

Shao J. *et. al.*, **Gefitinib Synergizes with Irinotecan to Suppress Hepatocellular Carcinoma via Antagonizing Rad51-Mediated DNA-Repair.** *PLoS ONE*. 11 (2016): 1-15.

Sharma DN. *et. al.*, **Role of gefitinib in patients with recurrent or metastatic cervical carcinoma ineligible or refractory to systemic chemotherapy: first study from Asia.** *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 23 (2013): 705-709.

Shingleton HM *et. al.*, **Human cervical intraepithelial neoplasia: fine structure of dysplasia and carcinoma in situ.** Cancer Research. 28 (1968): 695–706.

Uno T *et. al.*, **Postoperative radiation therapy for carcinoma of the uterine cervix.** Radiation Medicine. 24 (2006): 91–97.

Viswanathan AN *et. al.*, **Influence of margin status and radiation on recurrence after radical hysterectomy in Stage IB cervical cancer.** International Journal of Radiation Oncology \* Biology \* Physics. 65 (2006): 1501–1507.

Wei Wu. *et. al.*, **Human ether-á-go-go gene potassium channels are regulated by EGFR tyrosine kinase.** Biochimica et Biophysica Acta. 1823 (2012): 282-289.

Xiaohua Z. *et. al.*, **Gefitinib Inhibits the Proliferation of Pancreatic Cancer Cells via Cell Cycle Arrest.** The Anatomical Record. 8 (2009): 1122-1127.

Yoshikazu O *et. al.*, **Imaging of the Uterine Cervix: ImagingPathologic Correlation. Radiographics.** Radiographics. 23 (2003): 425–445.