



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO  
NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE  
FARMACOLOGÍA

**“Efecto del astemizol en combinación con cisplatino  
en el tratamiento de carcinoma hepatocelular”**

**T E S I S**

Que presenta

**I.F. LILIANA LIZETH GARCÍA HERNÁNDEZ**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA**

Director de la tesis: Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo

**México, D.F.**

**DICIEMBRE, 2013**

## **DEDICATORIA**

*En memoria de mi hermano Israel García Hernández  
A mis padres y hermanos con mucho cariño por  
su apoyo incondicional en todo momento.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*Mi gratitud al Dr. F. Javier Camacho Arroyo, director de este proyecto, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continúa del mismo.*

*Quiero agradecer a mis compañeras Guadalupe Chávez, Violeta Zuñiga y Elizabeth Hernández por su paciencia y ayuda. Quisiera hacer extensiva mi gratitud al Dr. Pablo Muriel de la Torre por su colaboración en esta investigación. Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de mi familia y amigos. Parte de este proyecto fue financiado por el donativo del CONACyT No. 168102.*

*A todos ellos, muchas gracias.*

## RESUMEN

**Introducción.** El carcinoma hepatocelular es una enfermedad caracterizada por la proliferación descontrolada de células anormales del hígado, es la quinta neoplasia más frecuente. Son múltiples los factores de riesgo que se encuentran asociados al carcinoma hepatocelular, entre ellos destacan el virus de hepatitis B y C, el alcoholismo, la cirrosis, la diabetes, la obesidad, y las enfermedades metabólicas. Son pocos los fármacos que han demostrado ser eficaces en el tratamiento de carcinoma hepatocelular, estos son: doxorubicina, 5-fluorouracilo y cisplatino. En estudios recientes se ha demostrado que el canal de potasio eag1 tiene potencial oncogénico, y que su distribución en tejido normal es reducida, además en carcinoma hepatocelular la expresión de eag1 se encuentra elevada, lo anterior convierte al canal de potasio eag1 en un blanco terapéutico para el tratamiento de carcinoma hepatocelular, y a los agentes bloqueadores de eag1 (como el astemizol) como fármacos muy prometedores para tratar este tipo de cáncer. Estudios previos han demostrado que el astemizol por sí mismo es capaz de disminuir el tamaño tumoral en modelos de ratas con carcinogénesis inducida, observando también un efecto hepatoprotector, además de una disminución en la proliferación celular e inducción de apoptosis en la línea celular HepG2 proveniente de carcinoma hepatocelular de seres humanos.

**Objetivo.** En el presente proyecto se evaluó el efecto anticancerígeno del cisplatino en la línea celular de cáncer hepático Hep-G2, así como la combinación astemizol-cisplatino en un modelo animal de carcinogénesis hepática.

**Metodología.** Se estudió la proliferación celular por medio del ensayo de MTT en células Hep-G2. Modelo *in vivo* de carcinogénesis hepática con la administración de DEN: se formaron seis grupos, uno perteneciente a hígado sano, otro tratado con PBS, el control del carcinógeno y tres grupos más a los cuales se les indujo carcinogénesis y posteriormente se les dio tratamiento con astemizol ó cisplatino y astemizol conjuntamente con cisplatino respectivamente. El efecto antitumoral se evaluó por medio de análisis histopatológico y la cuantificación de actividad enzimática de la alanina amino transferasa y gamma glutamil transpeptidasa y finalmente se evaluó por RT-PCR el nivel del RNA mensajero de eag1.

**Resultados.** El cisplatino inhibió la proliferación celular de las células Hep-G2 a partir de la concentración de 10  $\mu$ M. Para el modelo de carcinogénesis el análisis histopatológico indicó que los tratamientos no tuvieron el efecto esperado debido a un acortamiento en la duración de administración de los fármacos, las demás determinaciones empataron con esto.

**Conclusiones.** El empleo de las células Hep-G2 no representa un buen modelo para evaluar interacción farmacológica con cisplatino a las concentraciones alcanzadas de este fármaco en suero de pacientes. El efecto antitumoral *in vivo* fue afectado por factores ajenos al modelo por lo que es necesario implementar un control de calidad adecuado del estado de salud de los animales previo al estudio.

## ABSTRACT

**Introduction.** Hepatocellular carcinoma is a disease characterized by uncontrolled proliferation of abnormal cells in the liver; it is the fifth most common neoplasm. There are multiple risk factors that are associated with hepatocellular carcinoma; among them are the infection with hepatitis B and C virus, alcoholism, cirrhosis, diabetes, obesity, and metabolic diseases. Few drugs have proven effective in the treatment of hepatocellular carcinoma, these are: doxorubicin, 5-fluorouracil and cisplatin. Recent studies have shown that the potassium channel eag1 has oncogenic potential and that its distribution in normal tissues is reduced, but in hepatocellular carcinoma eag1 expression is elevated. This makes the potassium channel eag1 a therapeutic target for the treatment of hepatocellular carcinoma, and its blocking agents (such as astemizole) as very promising drugs for treating this type of cancer. Previous studies have shown that astemizole is able to decrease tumor size in rat models of induced carcinogenesis, the hepatoprotective effect also observed and decrease decrease in cell proliferation and induction of apoptosis in the cell line HepG2 derived from human hepatocellular carcinoma.

**Aim.** In this project, the anticancer effect cisplatin in the liver cancer cell line Hep-G2, as well as in an animal model of liver carcinogenesis was assessed.

**Methods:** Cell proliferation and apoptosis in Hep-G2 cells was studied by the MTT assay and flow cytometry, respectively. *In vivo* model of liver carcinogenesis with the administration of DEN: six groups were formed, one belonging to healthy liver, another treated with PBS, the third one was the control of the carcinogen, and three groups in which carcinogenesis was induced and subsequently given treatment of astemizole, cisplatin or cisplatin + astemizole respectively. The antitumor effect was assessed by histopathology, and quantification of enzyme activity of alanine aminotransferase and glutamyl transpeptidase. Finally, the level of eag1 mRNA was assessed by RT-PCR.

**Results.** Cisplatin inhibited cell proliferation of Hep-G2 cells at 10  $\mu$ M. The histopathological analysis from the carcinogenesis model showed that the treatments did not have the expected effect probably due to the shortening of the duration of drug administration, the other analysis match with this.

**Conclusions.** Hep-G2 cells do not represent a good model to evaluate drug interaction with cisplatin at clinical concentrations achieved from this drug. The *in vivo* antitumor effect was affected by factors non-related to the model, thus it is necessary to implement an adequate quality control of the health status of the animals prior to the study.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
Índice de figuras	v
Índice de tablas	vi
1.0 Introducción	1
1.1 Cáncer	1
1.2 Carcinoma hepatocelular	3
1.2.1 Definición	3
1.2.2 Epidemiología	3
1.2.3 Factores de riesgo	4
1.2.4 Diagnóstico	5
1.2.5 Tratamiento	5
1.3 Canales de potasio eag1	6
1.3.1 Papel de los canales de potasio en proliferación celular	6
1.3.2 Estructura del canal de potasio eag1	7
1.3.3 Propiedades electrofisiológicas, función y expresión	8
1.3.4 Papel oncogénico de eag1	9
1.3.5 Regulación	10
1.3.6 Eag1 como marcador de cáncer	10
1.4 Astemizol	11
1.4.1 Propiedades farmacológicas	11
1.4.2 El astemizol como un fármaco anticáncer emergente	12
1.4.3 Múltiples blancos del astemizol	13
1.4.3.1 Glicoproteína P	13
1.4.3.2 Receptores H1	13
1.4.3.3. Canal de potasio herg	14
1.5 Cisplatino	14
1.5.1 Propiedades farmacológicas del cisplatino	15
1.5.2 Cisplatino en carcinoma hepatocelular	15
2.0 Justificación e hipótesis	17
2.1 Justificación	17
2.2 Hipótesis	17
3.0 Objetivos	18
3.1 Objetivo general	18
3.2 Objetivos particulares	18
4.0 Material y métodos	19
4.1 Cultivo celular	19
4.2 Ensayos de proliferación celular	19
4.3 Modelo animal	19
4.4 Análisis histopatológico	22
4.5 Cuantificación de la actividad de ALT en suero	22

# ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
4.6 Cuantificación de la actividad de GGT en suero	23
4.7 Determinación de la actividad GGT en tejido	25
4.8 Expresión de mRNA de eag1 en hígado	25
4.9 Análisis estadístico	25
5.0 Resultados	26
5.1 Efecto antiproliferativo (in vitro)	26
5.1.1 Efecto citotóxico del cisplatino	26
5.2 Efecto antitumoral (in vivo)	27
5.2.1 Evaluación macroscópica de hígados	27
5.2.2 Pesos relativos de los hígados tratados	28
5.2.3 Reporte histopatológico de los hígados tratados	28
5.2.4 Actividad alanino amino transferasa en suero	29
5.2.5 Actividad gamma glutamil transpeptidasa en suero	30
5.2.6 Actividad GGT en tejido hepático	30
5.2.7 RT-PCR de eag1	32
6.0 Discusión	33
7.0 Conclusión	37
8.0 Perspectivas	38
9.0 Referencias	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Habilidades distintivas del cáncer	2
Figura 2. Factores de riesgo de carcinoma hepatocelular	5
Figura 3. Estructura del canal de potasio eag1	8
Figura 4. Expresión de eag1 en el cuerpo humano	9
Figura 5. Estructura química del astemizol	11
Figura 6. Estructura química del cisplatino	15
Figura 7. Modelo animal de carcinogénesis hepática	21
Figura 8. Efecto citotóxico del cisplatino en células Hep-G2	26
Figura 9. Hígados extraídos de los grupos tratados y controles	27
Figura 10. Actividad enzimática de ALT en suero	29
Figura 11. Actividad enzimática de GGT en suero	30
Figura 12. GGT en tejido hepático	31
Figura 13. Porcentaje de tejido GGT positivo	32
Figura 14. Expresión de mRNA de eag1	32



## ÍNDICE DE TABLAS

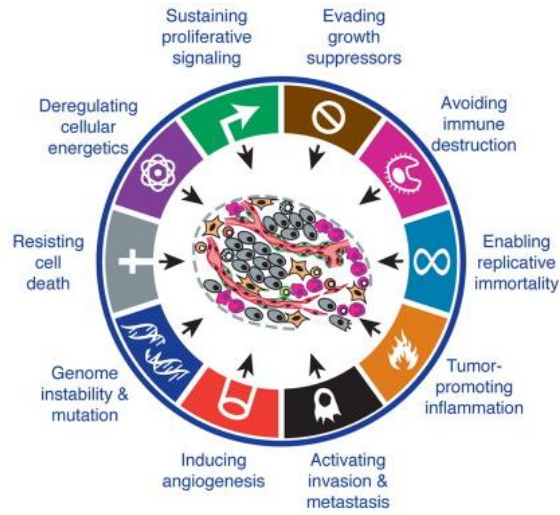
	Página
Tabla 1. Curva estándar de la alanino amino transferasa	23
Tabla 2. Metodología de la cuantificación de la actividad de la ALT	23
Tabla 3. Curva estándar de la gamma glutamil transpeptidasa	24
Tabla 4. Peso relativo de los hígados	28
Tabla 5. Histopatología de hígados	29

# 1.0 Introducción

## 1.1 Cáncer

El cáncer comprende a toda una familia de enfermedades, cuyo origen se establece en células alteradas que tienen como principal característica un crecimiento anormal dado por modificaciones en los mecanismos de proliferación y muerte celular [1].

El cáncer es considerado como una enfermedad multifactorial, ya que para su desarrollo intervienen varios elementos que se reducen a cambios genéticos (alteración en la secuencia de bases del DNA) que son heredables y cambios epigenéticos (cambio en la pauta de expresión génica). Esto permite que las células adquieran nuevas características que las posibilitan a evolucionar a un estado de malignidad. Estas características son representadas en la figura 1 y son mejor conocidas como “habilidades distintivas del cáncer” e incluyen el mantenimiento de señales proliferativas, evasión de supresores tumorales, activación de invasión y metástasis, permisión de mortalidad replicativa, inducción de angiogénesis, resistencia a muerte celular. En la última década, se ha dado un progreso tal que se han añadido cuatro habilidades distintivas del cáncer emergentes, estas son reprogramación de metabolismo energético y evasión de destrucción inmune, inestabilidad genómica y mutación, promoción tumoral por inflamación [2].



**Figura 1.** Habilidades distintivas del cáncer. Esta figura comprende las diez actualmente establecidas características adaptativas de las células cancerígenas [2].

Un crecimiento anormal de células ocasiona la formación de una masa, la cual se denomina tumor. Existen dos tipos de tumores, si el cumulo de células se mantiene localizado en una masa única y no se disemina se le llama tumor benigno, por el contrario, cuando las células tienen la capacidad de invadir tejido circundante se denomina tumor maligno, estas células propician la destrucción de órganos y tejidos, además de que tienen la habilidad de introducirse en la circulación sanguínea o linfática y de esta manera diseminarse hacia otros órganos [3-4].

Los elementos básicos de cualquier tumor son el parénquima, que está constituido por células transformadas, las cuales determinan el comportamiento biológico así como de estas se deriva el nombre del tipo de cáncer, por otra parte el estroma, consiste en tejido conjuntivo, vasos sanguíneos y células inflamatorias provenientes del órgano huésped cuya principal función es aportar las bases para el crecimiento de las células del parénquima [3].

El cáncer se clasifica de acuerdo al tipo celular del cual se deriva, de esta forma el cáncer que se origina en células epiteliales se llama "carcinoma", mientras que aquel cuya procedencia es de tejido conjuntivo y células musculares se denomina "sarcoma", por otra parte las "leucemias" se originan en células hematopoyéticas. Aproximadamente el 90% de los cánceres humanos son carcinomas [3-4].

## 1.2 Carcinoma hepatocelular

### 1.2.1 Definición

El cáncer hepático se manifiesta de diversas formas: colangiocarcinoma, angiosarcomas y hemangiosarcomas, cáncer secundario de hígado, hepatoblastoma y carcinoma hepatocelular. Este último se considera la neoplasia maligna primaria de hígado más frecuente en todo el mundo [5].

### 1.2.2 Epidemiología

El carcinoma hepatocelular es el quinto cáncer más frecuente a nivel mundial y es la tercera causa de muerte por cáncer. Tiene una incidencia anual que casi iguala a su mortalidad, la relación mortalidad/incidencia supera el 90% convirtiéndose en un problema de salud pública [6].

Más del 80% de la incidencia de carcinoma hepatocelular se presenta en regiones del sub-Sahara y el este de Asia, interesantemente China representa más del 50 % de los casos a nivel mundial [7].

Refiriéndose al sexo, los hombres presentan una incidencia mayor a carcinoma hepatocelular y aunque son controversiales, existen algunas hipótesis que tratan de explicar este fenómeno, una de ellas por ejemplo considera que los hombres tienen una mayor exposición a factores de riesgo, por otro lado una segunda hipótesis apunta a que factores endógenos como andrógenos, testosterona y un alto índice de masa corporal tienen influencia sobre la progresión de cáncer [5, 7].

La incidencia de carcinoma hepatocelular aumenta con la edad y la prevalencia es máxima a los 65 años, sin embargo nuevas tendencias indican el desarrollo de esta enfermedad en pacientes con menor edad [8].

En México, el carcinoma hepatocelular ocupa el séptimo lugar con una incidencia del 6.3% y un índice de mortalidad del 6.2 % [9].

### 1.2.3 Factores de riesgo

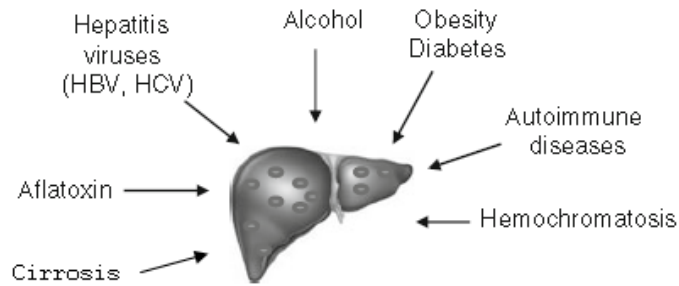
Los factores de riesgo son aquellos que aumentan la probabilidad de que se presente una enfermedad, en el caso de carcinoma hepatocelular como se observa en la figura 2, la mayoría de factores etiológicos son los que provocan cirrosis. Este es el principal factor de riesgo encontrándose como antecedente en 70% a 90% de los casos de carcinoma hepatocelular. El riesgo de desarrollar cáncer a partir de cirrosis varía de acuerdo al grado de fibrosis [5, 10].

Las infecciones crónicas con virus de hepatitis B (VHB) y C (VHC) son responsables de que el cáncer de hígado sea muy común en ciertas regiones. Se sugiere que estos virus promueven carcinogénesis induciendo la actividad necro-inflamatoria hepática y cirrosis [11-12].

El consumo excesivo de alcohol (50-70 g/día) representa un factor etiológico para desarrollar cirrosis y posteriormente cáncer. Existe evidencia de un efecto sinérgico entre este factor y la infección con VHB/VHC. La exposición a aflatoxinas se considera un agente causal de alta incidencia en regiones como en Asia, estas toxinas son producidas por *Aspergillus flavus* cuyo crecimiento está asociado a condiciones inapropiadas de almacenamiento de algunos granos como el maíz, arroz, cacahuates, etc. [13].

La hemocromatosis es una condición hereditaria potencialmente grave caracterizada por un aumento anormal de la absorción intestinal de hierro, generando gran acumulación de este elemento en el hígado [5, 12].

La obesidad y diabetes aumentan el riesgo a padecer cáncer, ya que propician la enfermedad de hígado graso y cirrosis [13].



**Figura 2.** Factores de riesgo de carcinoma hepatocelular. Principales agentes involucrados en la patogénesis de carcinoma hepatocelular. Tomado de referencia [14].

#### 1.2.4 Diagnóstico

El carcinoma hepatocelular inicialmente es asintomático, de tal manera que cuando presenta manifestaciones clínicas ya tiene tiempo en su evolución. Los principales síntomas son: pérdida de peso, falta de apetito, dolor en el abdomen, e ictericia entre otros [11].

El diagnóstico se basa en los siguientes procedimientos [11]:

- Análisis de sangre de la alfa-fetoproteína
- Estudios por imágenes:
  - Ecografía
  - Tomografía computarizada
  - Resonancia magnética
- Laparoscopia
- Biopsia

#### 1.2.5 Tratamiento

Aunque el diagnóstico de carcinoma hepatocelular es pobre, actualmente se ha implementado nuevos programas que permiten su pronta detección. En etapas tempranas las opciones terapéuticas tienen la finalidad de curar el cáncer, estas son las siguientes:

Resección quirúrgica, es la primera opción para pacientes con tumores únicos, sin embargo esta opción está limitada a hígado no cirrótico, ya que de lo contrario existe el alto riesgo de presentar complicaciones postoperatorias [15].

El trasplante hepático también representa una alternativa, los criterios para trasplante hepático son definidos por la United Network for Organ-Sharing que son tumores menores de 5 cm o 3 cm cada uno sin invasión vascular y sin enfermedad extrahepática [15-16].

Se presume que la ablación percutánea tiene gran eficacia ya que la supervivencia obtenida se asemeja a la de resección hepática, esta se realiza por medio de la instilación de sustancias químicas como el etanol y ácido acético o mediante la modificación de la temperatura intratumoral [15].

Una alternativa que ha mostrado beneficios en términos de supervivencia en pacientes con carcinoma hepatocelular intermedio es la quimioembolización, basado en la vascularización arterial del tumor. Se realiza una cateterización selectiva de la arteria hepática y la inyección de un agente quimioterapéutico [15].

Para tumores en estadios avanzados se considera la administración sistémica de quimioterapia que desafortunadamente es relativamente ineficaz y con una tasa de respuesta menor del 20% y una tasa de mortalidad hasta del 25% [15, 17]. Por lo anterior se requieren nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de carcinoma hepatocelular, una terapia recientemente propuesta son los canales iónicos, particularmente el canal de potasio eag1 [18].

### 1.3 Canales de potasio eag1

#### 1.3.1 Papel de los canales de potasio en proliferación celular

Se define un canal iónico como una proteína que forma un poro hidrofílico a través de la membrana por el que difunden iones específicos a favor de su gradiente electroquímico. Los canales iónicos son proteínas relevantes, ya que participan en muchos procesos fisiológicos como proliferación celular, en este proceso los canales que tienen un mayor impacto son los canales de  $K^+$  [19-20].

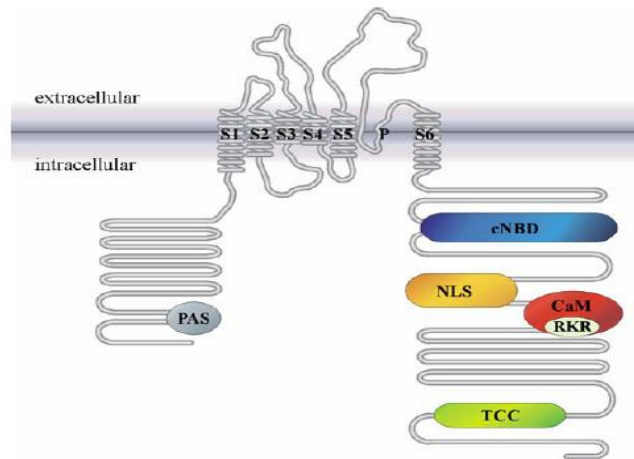
Una célula requiere la presencia de canales de  $K^+$  para el proceso de proliferación celular tanto en condiciones normales como en condiciones patológicas por ejemplo: el cáncer. En el cáncer un razonamiento que trata de explicar este fenómeno es que los cambios en el potencial de membrana, así como en la regulación del volumen celular son necesarios para la progresión del ciclo celular, y ambos procesos requieren la acción de canales de potasio [20].

### 1.3.2 Estructura del canal de potasio eag1

Un canal que sobresale por su papel en proliferación tumoral es el canal de  $K^+$  dependiente de voltaje eag1 (éter-à-go-go, Kv10.1, KCNH1), el locus de este canal se describió por primera vez en el análisis cromosomal de *Drosophila melanogaster*, se llevó a cabo un estudio del control del comportamiento por medio de mutantes neuronales, y se observó que este gen era el responsable de un fenotipo rítmico en las patas de las moscas tras inducir anestesia con éter [21].

Como lo muestra la figura 3 la estructura de este canal consiste de cuatro subunidades  $\alpha$  idénticas y cada subunidad consta de seis dominios transmembranales (S1-S6). La región del poro está formada por S5 y S6, además el dominio S4 actúa como sensor de voltaje, tanto el dominio carboxilo como amino terminal se encuentran en la región citoplasmática. Por su parte el amino terminal incluye un dominio PAS (se sugiere que censa la ausencia del oxígeno y se encuentra asociado a la activación del factor inducible de hipoxia (HIF1)) y el carboxilo contiene un dominio de unión a nucleótidos cíclicos, sitios de unión a calmodulina, una secuencia de localización nuclear y un dominio de tetramerización [22].





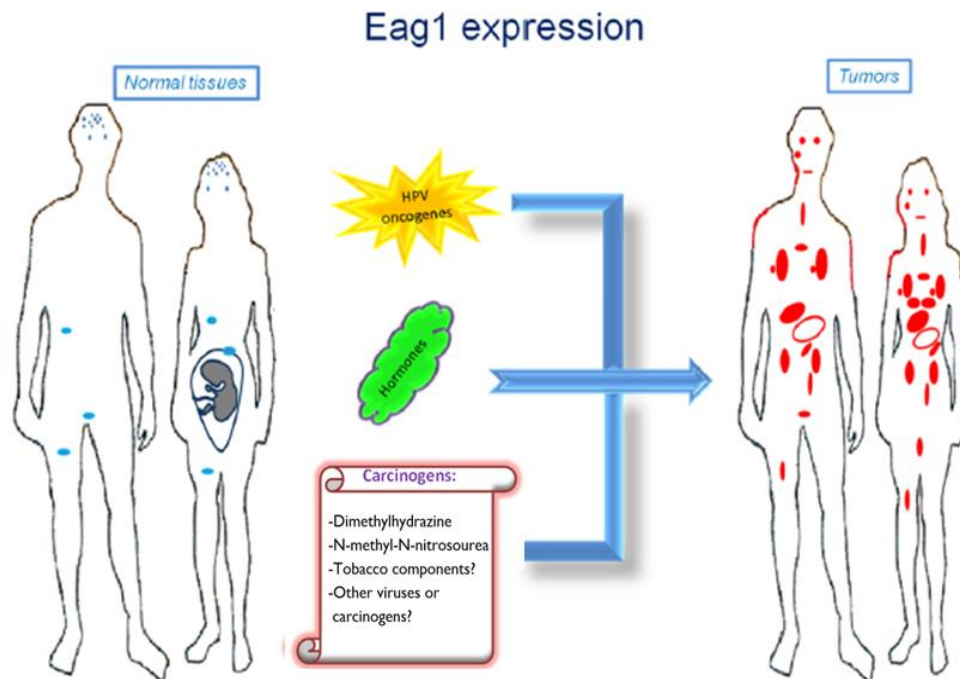
**Figura 3.** Estructura del canal de potasio eag1. Cada una de cuatro subunidades idénticas consiste de seis dominios transmembranales, la región amino y carboxilo terminal se encuentran en región interna de la célula. Tomado de referencia [23].

### 1.3.3 Propiedades electrofisiológicas, función y expresión

Relacionado a sus propiedades electrofisiológicas la característica más notable es el curso temporal de la activación de corriente la cual se activa lentamente y no se inactiva durante una despolarización sostenida, además se presenta el fenómeno Cole-More en donde la activación de corriente se da lentamente con la influencia de un pre-pulso muy negativo y una activación mucho más rápida a una menor hiperpolarización [24].

La función del canal de potasio eag1 aún se desconoce, sin embargo existen algunos reportes que sugieren su participación en el proceso de diferenciación de mioblastos humanos ya que este fenómeno correlaciona con cambios en el potencial de reposo y un aumento en la expresión de eag1 [24].

La figura 4 representa la expresión del canal eag1, la cual es muy restringida en tejido normal, comúnmente se limita a órganos como cerebro, mioblastos, placenta, testículos y glándula adrenal; no obstante bajo la influencia de algunos factores etiológicos, la expresión de este canal se hace abundante, pero en tejido tumoral [25].



**Figura 4.** Expresión de eag1 en el cuerpo humano. El canal eag1 muestra una distribución restringida en tejido normal, pero es más abundante en muchos tumores bajo una regulación por factores asociados a cáncer. Tomado de referencia [22].

#### 1.3.4 Papel oncogénico de eag1

El canal eag1 se expresa en diversas líneas celulares de cáncer de neuroblastoma, mama, cáncer cervical; y también en biopsias de tumores de cervix, mama, pulmón, hígado, próstata, colon, ovario, gástrico, gliomas, leucemia; y diferentes tipos de sarcomas [22].

El canal de potasio eag1 es modulado por el ciclo celular y el citoesqueleto, sugiriendo que se expresa en eventos celulares asociados con el rearrreglo del citoesqueleto, por ejemplo en el proceso de migración de células cancerosas [18].

La transfección del canal eag1 en células de mamífero les confiere un fenotipo maligno ocasionando un aumento en proliferación celular, estas células adquieren la capacidad de crecer en bajas concentraciones de suero y la pérdida de inhibición por contacto. En un modelo *in vivo*, el canal eag1 favorece la progresión tumoral, además estos tumores se presentan friables y hemorrágicos. Adicionalmente se ha reportado que eag1 regula la homeostasis de oxígeno e

induce angiogénesis tumoral. Estos datos sugieren que la expresión del canal representa una ventaja para la proliferación de células tumorales [26-27].

Por otra parte cuando la expresión génica del canal es inhibida por oligonucleótidos antisentido, o bien si se irrumpe el flujo de iones potasio con agentes bloqueadores como el astemizol o imipramina, no solo hay una reducción en el RNA y en síntesis de DNA si no también hay una disminución de la proteína funcional localizada en la membrana. Estos efectos tienen un impacto directo en proliferación celular, la cual se ve reducida [26].

Es importante mencionar que actualmente no se ha definido por completo el mecanismo por el cual el canal eag1 participa en cáncer, no obstante las teorías existentes al respecto indican que su función se atribuye de manera parcial al flujo de iones, por otra parte se demostró que una mutación en la permeabilidad iónica no evade por completo la proliferación celular, esto hace pensar que la estructura del canal y su posible interacción con otras proteínas son importantes para su función oncogénica [20, 27].

### 1.3.5 Regulación

Se ha evidenciado que la expresión del canal eag1 es regulada a la alta por algunos factores como la presencia de oncogenes E6/E7 del virus del papiloma humano, igualmente la expresión del canal depende de la presencia de estrógenos actuando a través del receptor a estrógenos  $\alpha$ . Contrariamente se ha reportado que la expresión de eag1 se suprime por la presencia de calcitriol por un mecanismo dependiente del receptor a vitamina D [28-29].

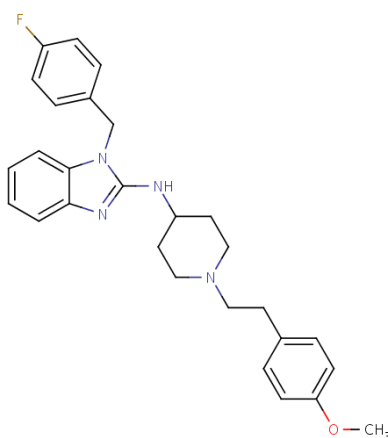
### 1.3.6 Eag1 como marcador de cáncer

Debido a su baja expresión en tejido normal y su elevada expresión ectópica en la mayoría de tumores sólidos, se ha propuesto al canal eag1 no solo como marcador potencial de cáncer sino también como marcador temprano ya que tiene la característica de ser regulado por factores etiológicos de cáncer y ser detectado en lesiones premalignas o condiciones que dirigen a cáncer, por ejemplo: lesiones cervicales premalignas como lesiones intraepiteliales de alto y bajo grado que pueden progresar a cáncer cervical y diverticulitis que puede

evolucionar a cáncer de colon [22, 30-31]. A pesar de que no existen bloqueadores específicos del canal de potasio eag1, algunos fármacos como el astemizol muestran una inhibición de eag1 [32].

#### 1.4 Astemizol

El astemizol (figura 5) es un antihistamínico no sedante de segunda generación y de efecto prolongado, no atraviesa barrera hematoencefálica de manera significativa por lo que la depresión del sistema nervioso central es mínima. Es empleado para el tratamiento sintomático de manifestaciones alérgicas como la rinitis, conjuntivitis, urticaria, etc. [32-33].



**Figura 5.** Estructura química del astemizol. Tomado de referencia [32].

##### 1.4.1 Propiedades farmacológicas

El astemizol compite con la histamina por sitios de unión al receptor de histamina H1 en tracto gastrointestinal, útero, vasos sanguíneos grandes, y músculo bronquial. La unión reversible de astemizol al receptor H1 suprime la formación de edemas, erupciones, y prurito resultante de la actividad histamínica [32].

El astemizol es rápidamente absorbido en el tracto gastrointestinal, pero cuando se administra con alimentos, su biodisponibilidad se ve reducida al 60%. La concentración plasmática máxima se logra de 1-4 horas posteriores a la

administración, pero los efectos comienzan a manifestarse después de 2-3 días. La vida media de distribución es de 20 horas y el efecto antihistamínico es usualmente máximo entre 9 y 12 días posteriores a la administración. El astemizol es casi completamente metabolizado en el hígado por el citocromo P450 3A4 produciendo principalmente los metabolitos desmetilastemizol y norastemizol. El astemizol se une en un 96.7% a proteínas plasmáticas y es excretado vía fecal [32-33].

#### 1.4.2 El astemizol como un fármaco anticáncer emergente

El efecto anticancerígeno del astemizol se atribuye principalmente al bloqueo no selectivo del poro abierto del canal de potasio oncogénico eag1, por tanto el astemizol es considerado como un fármaco prometedor para el tratamiento de diversas neoplasias [33-34].

Múltiples investigaciones han demostrado el efecto antiproliferativo del astemizol, por ejemplo: en queratinocitos la sobreexpresión del canal eag1 dependiente de la presencia de los oncogenes E6/E7 del virus del papiloma humano resultó en un aumento en proliferación celular, la cual se ve disminuida cuando estas células son tratadas con astemizol a una concentración de 10  $\mu$ M, interesantemente esta concentración fue capaz de inducir apoptosis [29]. Este mismo efecto también se ha observado en la línea celular de carcinoma mamario MCF-7 [35] y en células derivadas de carcinoma ductal invasivo [28, 36].

En modelos *in vivo*, el tratamiento con astemizol es capaz de inhibir progresión tumoral. En el año 2008 se desarrolló un modelo animal empleando ratones hembra con inmunodeficiencia severa combinada (SCID por sus siglas en inglés), a los cuales se les implantaron células CHO derivadas de ovario de hámster chino transfectadas con el canal eag1, células CHO wild type y células de carcinoma ductal de glándula mamaria MDA-MB-435S que de manera natural expresan al canal eag1. Estos ratones se mantuvieron hasta detectar la formación de tumores sólidos palpables y de un diámetro aproximado de 2 mm, posteriormente se administró astemizol a una dosis de 50 mg/kg vía oral. El crecimiento tumoral inducido por la implantación de células que expresaron eag1 fue claramente inhibido por el astemizol [27].

El astemizol también sinergiza el efecto antiproliferativo del calcitriol aumentando la biodisponibilidad del calcitriol y también su actividad en cultivos primarios de carcinoma ductal invasivo [28].

#### 1.4.3 Múltiples blancos del astemizol

El astemizol es un fármaco que como agente anticancerígeno puede tener un enfoque multifacético, ya que adicional al bloqueo del canal Eag1 tiene otros blancos proteicos cuyo papel es importante en proliferación tumoral. Estos se mencionan a continuación:

##### 1.4.3.1 Glicoproteína P

Es el producto del gen *mdr1* y constituye un sistema de detoxificación natural que normalmente se expresa en varios tejidos humanos asociados con funciones secretoras, como por ejemplo: canalículos biliares, conductos pancreáticos, intestino delgado y grueso. En tejido neoplásico provoca un fenotipo de resistencia simultánea a múltiples fármacos, un aumento en su expresión es señalado como un factor pronóstico adverso en algunos tumores. Por su parte el astemizol inhibe la actividad de la glicoproteína como bomba extractora de manera dosis dependiente, esto se demostró en el año 2000 al realizar experimentos con doxorubicina en células de leucemia [37-38].

##### 1.4.3.2 Receptores a histamina H1

Las vías activadas por el astemizol como antihistamínico se encuentran involucradas de manera directa en el desarrollo de cáncer. La histamina es un constituyente natural del cuerpo y muestra sus diversos efectos a través de la activación de cuatro tipos de receptores (H1-H4) [39]. En tejido tumoral, los niveles de esta amina biogénica se encuentran elevados sugiriendo su participación en efectos proliferativos, estos efectos han sido reportados en líneas derivadas de tumores colorectales, de mama, melanoma, páncreas, hígado etc. [40-43]. En células de melanoma, la inhibición de la expresión de la enzima L-histidina descarboxilasa (encargada de la síntesis de histamina)

disminuye significativamente proliferación celular [44]. Los efectos de la histamina son controversiales, ya que estos dependen del tipo celular [33]. Con respecto a lo anterior destacan algunos antihistamínicos como la cimetidina que inhibe el crecimiento celular e induce apoptosis; y la terfenadina que inhibe el crecimiento tumoral [45-46].

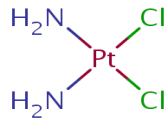
#### 1.4.3.3 Canal de potasio herg

Este canal está implicado en proliferación celular, sin embargo el hecho de que su expresión normal en corazón sea alta, desencadena particularmente un efecto adverso grave por sobredosificación con astemizol, este es la prolongación del intervalo QT, condición que aumenta la propensión a arritmias ventriculares y muerte súbita. Por lo anterior el astemizol fue retirado del mercado en muchos países no obstante en México este fármaco sigue comercializándose por varios laboratorios en forma de tabletas o suspensión oral [47].

Por todo lo anterior, es importante resultar las propiedades del astemizol, sin olvidar los tratamientos actuales, uno de los fármacos más empleados para el tratamiento de carcinoma hepatocelular es el cisplatino [48].

#### 1.5 Cisplatino

El cisplatino (figura 6) es un fármaco quimioterapéutico basado en platino, es considerado el primer miembro de su clase. Como agente antineoplásico está indicado para el tratamiento de tumor testicular metastásico tumor de ovario y cáncer de vejiga avanzado [49].



**Figura 6.** Estructura química del cisplatino. Tomado de referencia [49].

### 1.5.1 Propiedades farmacológicas del cisplatino

Dado que el cisplatino es un agente alquilante ejerce sus efectos por medio de tres mecanismos principales: 1) acopla grupos alquilo a bases del DNA resultando en la fragmentación del DNA por enzimas reparadoras en su intento de reemplazar las bases alquiladas, previniendo la síntesis de DNA y transcripción de RNA del DNA afectado, 2) produce un daño en el DNA por medio de la formación de puentes cruzados entre átomos del DNA, y de esta forma previene la separación de hebras del DNA para su síntesis o transcripción, 3) La inducción de mutaciones por un mal apareamiento de bases. El cisplatino se metaboliza por una rápida conversión no enzimática a metabolitos inactivos, presenta una vida media de 20-30 minutos, se une en más de 90% a proteínas plasmáticas, su eliminación es principalmente vía renal. Su efecto sobre el DNA persiste durante varios días después de su administración [49].

### 1.5.2 El cisplatino en carcinoma hepatocelular

Estudios clínicos en fase 2 reportan que existe una respuesta parcial del 14% por parte de pacientes cuando se administra cisplatino, mientras que ningún paciente logra una respuesta completa [48].

Estudios recientes en pacientes involucran la combinación de cisplatino con algún otro compuesto con el objetivo de aumentar la tasa de sobrevivencia en pacientes con carcinoma hepatocelular [50-51]. Cuando se emplea la combinación de cisplatino y gemcitabina se logra una respuesta parcial en 20% de los pacientes con carcinoma hepatocelular avanzado, y el 43% de los pacientes se mantiene en enfermedad estable [52], por otra parte la combinación



de cisplatino y 5-FU y mitoxantrona ofrece una respuesta parcial del 27%, en este caso se indica una actividad antitumoral significativa con una toxicidad aceptable y una tasa de supervivencia de 1 año [51].

En el caso de carcinoma hepatocelular metastásico la combinación de cisplatino y capecitabina ofrece un efecto modesto con una supervivencia media total de un año y medio [50].

Por lo anterior se puede decir que el cisplatino es un fármaco bien establecido en el mercado de muchos países, sin embargo aún se requieren estudios en pacientes con carcinoma hepatocelular para explorar sus efectos bajo diferentes condiciones, de igual forma se debe evaluar el grado de toxicidad, ya que este es un proceso limitante cuando se hace uso de quimioterapia [48, 50-52].

## 2.0 JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

### 2.1 Justificación

A nivel mundial el carcinoma hepatocelular representa una de las principales causas de muerte asociadas a enfermedades del hígado debido a una prevalencia principalmente en infecciones ocasionadas por el virus de hepatitis C, así como de otros factores que contribuyen al desarrollo de carcinoma hepatocelular.

Actualmente la detección del carcinoma hepatocelular como en otros tipos de cáncer es deficiente y es común que se detecte cuando ya se presentan algunos síntomas y probablemente el estadio del carcinoma hepatocelular es avanzado. Bajo esta situación el tratamiento más adecuado es la quimioterapia, la cual presenta bajos niveles de eficacia debida a que la respuesta a quimioterapia no es duradera por la resistencia que se presenta por parte de las células tumorales hacia los fármacos empleados.

Lo anterior deriva en un aumento en el índice de mortalidad y como tal en un problema de salud pública, por lo que es necesario contar con nuevos fármacos que permitan una mayor calidad de vida y de ser posible aumentar el índice de supervivencia en pacientes con esta enfermedad.

Por lo anterior en el presenta trabajo exploramos una posible nueva alternativa al tratamiento de carcinoma hepatocelular.

### 2.2 Hipótesis

La combinación de astemizol y cisplatino tienen un efecto antineoplásico mayor a comparación del efecto de cada fármaco por separado en el tratamiento de carcinoma hepatocelular.

## 3.0 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo general

Investigar el posible efecto anti cancerígeno del astemizol en combinación con cisplatino sobre la línea celular Hep-G2, así como en un modelo animal de carcinogénesis hepática.

### 3.2 Objetivos particulares

Determinar el efecto antiproliferativo del co-tratamiento de astemizol y cisplatino en células Hep-G2, así mismo, determinar las posibles interacciones farmacológicas entre ambos compuestos.

Determinar el efecto antitumoral del tratamiento con astemizol y cisplatino en un modelo *in vivo*.

Realizar un análisis histopatológico en hígados de las ratas de los diferentes grupos de tratamiento.

Evaluar la respuesta de la expresión del marcador de lesiones preneoplásicas gamma glutamil transpeptidasa (GGT), y determinar la actividad de la enzima alanino amino transferasa (ALT) en el modelo *in vivo*.

Determinar los niveles de mRNA de *eag1* en el modelo *in vivo*.

## 4.0 MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 Cultivo celular

Se llevó a cabo el cultivo celular empleando células de cáncer hepático Hep-G2 adquiridas en la ATCC (American Type Culture Collection) a través de IECSA Internacional de Equipos Científicos, S.A. de C.V. en México, estado de México. Estas células se mantuvieron con el medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) enriquecido con 10% de suero fetal bovino, 1% de glutamina, 1% de piruvatos y 1% de aminoácidos no esenciales. Las células fueron incubadas con astemizol (2.5, 5, 7.5, 10  $\mu$ M), DMSO (vehículo), o cisplatino (2, 10, 20, 30, 50  $\mu$ M a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. El tiempo de incubación fue de 72 horas.

### 4.2 Ensayos de proliferación celular

La proliferación celular se evaluó por el ensayo colorimétrico de Mossman, el cual se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color azul (formazán). Este ensayo detecta células vivas, y la señal generada depende del grado de activación de las células. El MTT fue disuelto en PBS a 5 mg/mL, posteriormente esta solución fue agregada a los pozos del ensayo y las placas fueron incubadas a 37 °C por 4 horas, finalmente se agregó SDS para disolver los cristales de formazán. Los resultados se leyeron a una longitud de onda de 595 nm en el espectrofotómetro Multiscan F de Thermo scientific [53].

### 4.3 Modelo animal

#### Carcinogénesis hepática

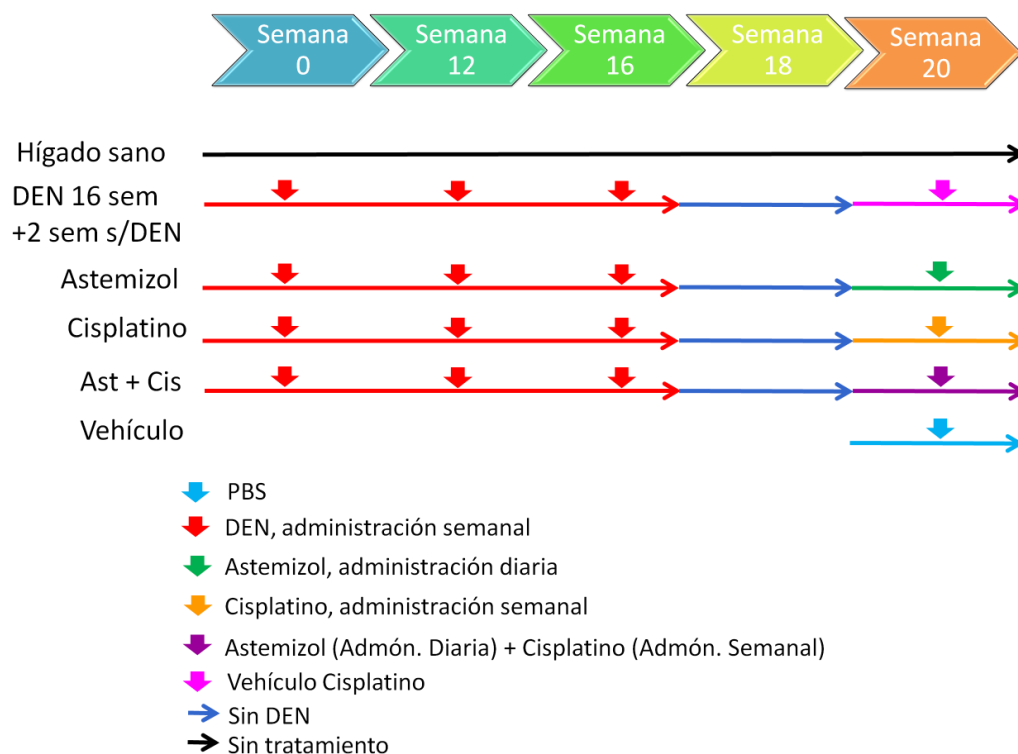
Se emplearon ratas Wistar macho de un peso de 200 g, las cuales recibieron una inyección intraperitoneal de N-nitrosodietilamina (DEN, un potente carcinógeno) a una dosis de 50 mg/kg de peso corporal una vez por semana y por 16 semanas se siguió con un periodo de descanso del carcinógeno de dos

semanas para completar el proceso de evolución de cáncer. Este modelo es muy práctico ya que asemeja el proceso multietapa del carcinoma hepatocelular en pacientes, a la semana 12 hay presencia de cirrosis y lesiones preneoplásicas, evolucionando a múltiples tumores tipo cáncer hepático [54-56].

#### Tratamiento farmacológico

Los tratamientos farmacológicos comenzaron después de la generación del cáncer y por un periodo de dos semanas (semana 18-20). El astemizol se preparó a partir de una solución madre en DMSO, y se aforó posteriormente a 250 mL, la concentración final de esta solución fue de 10 mg/mL, la dosis a la que se administró fue de 50 mg/kg de peso corporal por vía oral y diariamente. Para la solución de cisplatino se disolvió 2.5 miligramos de cisplatino en 1 mL de una solución de PBS. Esta se administró vía intraperitoneal a una dosis de 5 mg/kg de peso corporal cada cinco días. La combinación de astemizol y cisplatino se administró considerando su administración, dosis y tiempo de manera individual.

Se generaron 6 grupos de ratas con un número de muestra de inicio de 8 y con las características que se observan en la figura 8, al respecto es necesario mencionar que el grupo control del carcinógeno (DEN + PBS) recibió el vehículo del cisplatino (PBS) en lugar de tratamiento farmacológico.



**Figura 7.** Modelo animal de carcinogénesis hepática. Las flechas rojas representan la inyección intraperitoneal semanal de DEN durante 16 semanas (el curso temporal se indica de manera simplificada), posterior a la carcinogénesis se da la tratamiento farmacológico el cual está representado por flechas de color verde amarillo y morado.

Al concluir los tratamientos farmacológicos las ratas fueron sacrificadas con guillotina y se extrajo sangre y los hígados para posteriores determinaciones.

La sangre se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos para separar el suero.

Inicialmente el tratamiento farmacológico se planeó para cuatro semanas posteriores a la inducción del cáncer, sin embargo la mortalidad en las ratas comenzó a aumentar drásticamente, motivo por el cual se dio el tratamiento farmacológico solo por dos semanas. No obstante el tamaño de muestra final quedó como sigue: Hígado sano n=8; DEN + PBS n=3; astemizol n=5; cisplatino n=3; astemizol + cisplatino n=4; vehículo n=3.

#### 4.4 Análisis histopatológico

Este se llevó a cabo con la colaboración de personal del Instituto Nacional de Ciencias y Medicina Genómica. Se realizaron cortes de hígado y se tiñeron con hematoxilina y eosina para su evaluación por un patólogo.

#### 4.5 Cuantificación de la actividad ALT en suero

La cuantificación de la enzima ALT se realizó por el método de Reitman y Frankel [57], en el cual primeramente se realiza una curva de calibración de la actividad de la enzima, con los compuestos indicados en la tabla 1.

Se prepararon los siguientes reactivos:

Buffer de fosfatos: 0.1 M, pH 7.4: Se mezcló 840 mL de solución 0.1 M de fosfato disódico con 160 mL de solución 0.1 M de fosfato monopotásico.

Solución de sustrato: Se disolvió 1.78 g de D/l alanina y 30 mg de ácido alfaoxoglutarico en solución buffer; se añadió 0.5 mL de hidróxido de sodio 1 N. y se completó hasta 100 mL con solución buffer. Conservar a 4 °C.

Reactivo cromógeno: Se disolvió 200 mg de 2,4 dinitrofenilhidrazina en ácido clorhídrico 1 N caliente y se completó hasta 1 L con HCl 1N. La concentración de la solución final fue 1mM.

Solución estándar de piruvato: (1mmol/mL) Se disolvió 11 mg de piruvato sódico en 100 mL de solución buffer.

El comportamiento de la curva de calibración es lineal, la pendiente obtenida fue de 1.7879.

**Tabla 1.** Compuestos para la curva estándar de la alanino amino transferasa.

<b>Tubo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
<b>Solución sustrato (mL)</b>	250	225	200	175	150	125	100
<b>Solución estándar de piruvato (mL)</b>	---	25	50	75	100	125	150
<b>Buffer de fosfatos (mL)</b>	50	50	50	50	50	50	50
<b>Reactivo cromógeno (mL)</b>	250	250	250	250	250	250	250
<b>NaOH 0.4 N (mL)</b>	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
<b>Piruvato (mmoles)</b>	---	0.025	0.05	0.075	0.1	0.125	0.150

Esta técnica considera un duplicado de cada muestra de suero, así como un blanco por muestra. El procedimiento se realizó con los compuestos de la tabla 2:

**Tabla 2.** Compuestos para la cuantificación de la actividad de la ALT.

	<b>Blanco (ml)</b>	<b>Problema (mL)</b>
<b>Solución sustrato</b>	0.25	0.25
<b>Suero problema</b>	----	0.050
<b>Mezclar y agitar suavemente, incubar a 37 °C durante 60 minutos.</b>		
<b>Reactivo cromógeno</b>	0.25	0.25
<b>Suero problema</b>	0.050	----
<b>Incubar a 37 °C durante 15 minutos.</b>		
<b>NaOH 0.4 N.</b>	2.5	2.5
<b>Leer los tubos a 515 nm.</b>		

#### 4.6 Cuantificación de la actividad GGT en suero

La GGT fue determinada por el método colorimétrico de Glossmann y Neville. La reacción es estimulada con glicil-glicina, la reacción comienza con la adición de la enzima que se encuentra presente en el suero y termina con la adición de ácido acético, el producto de reacción obtenido es la p-nitroanilina. Se considera un volumen de reacción de 1 mL, la reacción es lineal en el tiempo y la pendiente obtenida fue de 3.8265 [58].



La curva de estándar de gamma glutamil transpeptidasa se realizó con los compuestos de la tabla 3: Solución 1: se pesó 13.81 mg de p-nitroanilina y se llevó a 250 ml con ácido acético 1.5 M.

**Tabla 3.** Compuestos para la curva de estándar de gamma glutamil transpeptidasa.

TUBO NO.	SOLUCIÓN 1 (μl)	H <sub>2</sub> O (μl)	nmoles/ml	μmoles/ml
1	50	1950	10	<b>0.01</b>
2	100	1900	20	<b>0.02</b>
3	150	1850	30	<b>0.03</b>
4	250	1750	50	<b>0.05</b>
5	375	1625	75	<b>0.075</b>
6	500	1500	100	<b>0.1</b>
7	750	1250	150	<b>0.15</b>
8	<b>1000</b>	<b>1000</b>	<b>200</b>	<b>0.20</b>

1. En cada tubo se colocó:
  - 400 μL de Tris-HCl 200 mM, pH 8.2.
  - 100 μL MgCl<sub>2</sub> 200 mM.
  - 100μL Glicil-glicina 40 mM, pH 8.2.
  - 200 μL Gamma-glutamyl-p-nitroanilida 10 mM.
2. Previa incubación durante 10 minutos a 37°C.
3. Se inició la reacción con 200 μL de plasma.
4. Se incubó a 37°C por 30 minutos.
5. Se detuvo la reacción con 2 mL de ácido acético 1.5 M.
6. Se leyó la absorbancia a 410 nm se cuantifica la p-nitroanilina producida mediante la curva estándar.

Nota: Se hizo un blanco sustituyendo los 200 μL de suero por agua.

#### 4.7 Determinación de la actividad de GGT en tejido

La actividad de GGT en tejido se evaluó por medio de la técnica de histoquímica. Se utilizó como sustrato la g-glutamyl-1,4-metoxi-2-naftilamida (GMNA). Los cortes histológicos fueron fijados con etanol absoluto, y se

incubaron con una solución de GMNA, glicil-glicina y azul rápido en Tris base. Finalmente, los precipitados se fijaron con una solución de sulfato cúprico [59]. Se realizó la cuantificación de partículas por medio del programa ImageJ.

#### 4.8 Expresión mRNA de eag1 en hígado

Los niveles de mensajero de Eag1 se midieron por medio de la técnica PCR en tiempo real y por medio del método doble delta. Los experimentos de CT (por sus siglas en inglés, es el ciclo umbral) comparativos determinan el cambio de expresión de un gen en una muestra en relación con el mismo gen en una muestra de referencia. Se realizó empleando como gen constitutivo el HPRT (hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa).

Con los resultados de Ct de este gen para cada muestra se calculó la primer delta ( $\Delta Ct$ ) utilizando la siguiente fórmula:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ del gen endógeno}$$

La segunda delta ( $\Delta\Delta Ct$ ) fue calculada con la siguiente fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra problema} - \Delta Ct \text{ muestra control}$$

Finalmente la expresión relativa se calculó utilizando la fórmula:

$$\text{Expresión relativa} = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

#### 4.9 Análisis estadístico

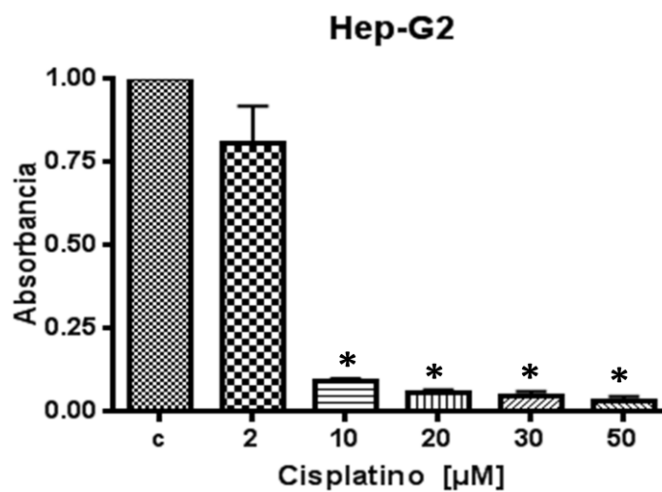
El análisis estadístico se llevó a cabo por medio de la ANOVA de una vía, seguida de la prueba de Tukey's para evaluar los resultados promedio entre todos los grupos, la prueba indica significancia estadística cuando el valor de probabilidad es menor a 0.05. Este análisis se realizó en el programa GraphPad Prism, versión 5.0

## 5.0 RESULTADOS

### 5.1 Efecto antiproliferativo (*in vitro*)

#### 5.1.1 Efecto citotóxico del cisplatino

El efecto antiproliferativo del cisplatino en las células Hep-G2 se observa en la figura 9, el hecho de que la proliferación celular disminuye de manera drástica a partir de la concentración de 10  $\mu\text{M}$ , fue motivo por el cual no se dio seguimiento a los ensayos de proliferación celular empleando astemizol.

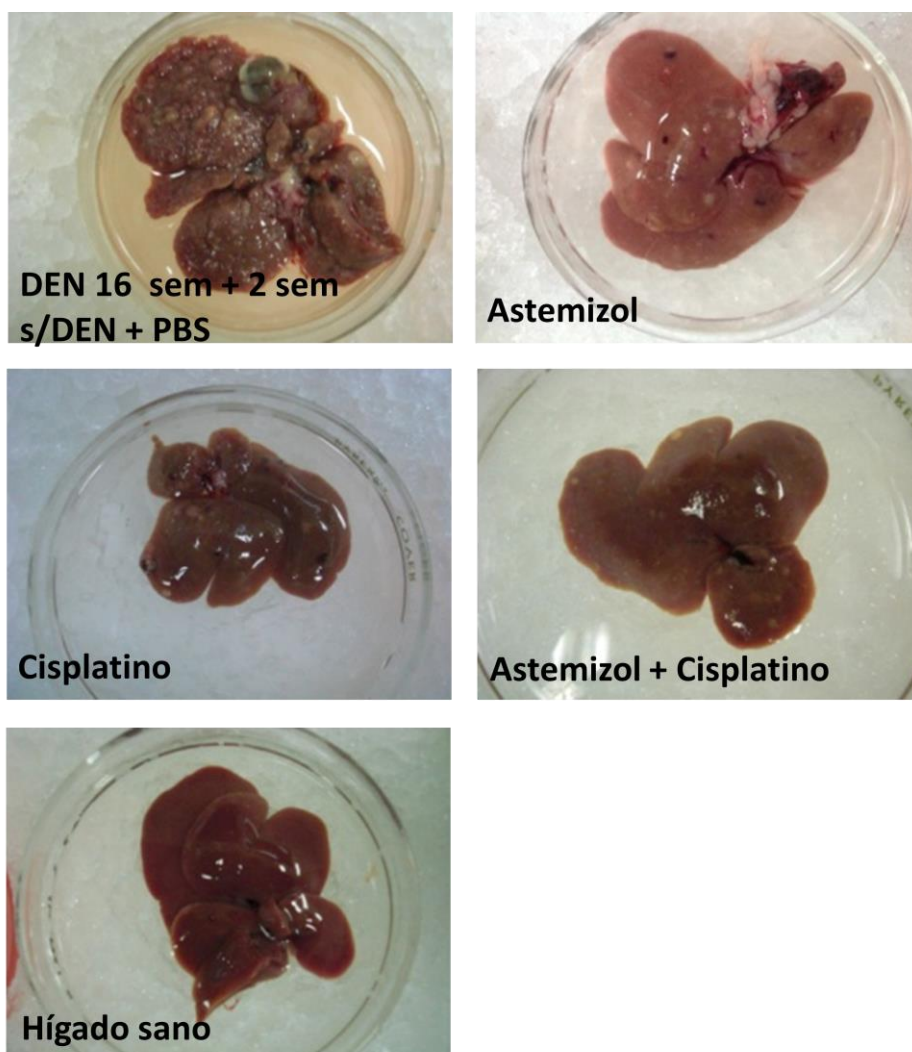


**Figura 8.** Efecto citotóxico del cisplatino en células Hep-G2. Se observa diferencia significativa para las concentraciones de 10, 20, 30 y 50  $\mu\text{M}$  contra el control empleando la prueba de Tukey's, el valor de probabilidad es  $<0.05$

## 5.2 Efecto antitumoral (*in vivo*)

### 5.2.1 Evaluación macroscópica de los hígados tratados

En las imágenes indicadas en la figura 10 se observa un hígado representativo de cada uno de los grupos formados. En el hígado control del carcinógeno (DEN 16 sem + 2 sem s/DEN +PBS) se visualizan nódulos tumorales y regiones de necrosis, con respecto a los hígados correspondientes a los tratamientos farmacológicos no fue posible determinar visualmente cual presenta un mayor efecto antitumoral.



**Figura 9.** Hígados extraídos de los grupos tratados. Del modelo *in vivo*, se extrajeron los hígados pertenecientes a las ratas de los diferentes grupos, estas imágenes corresponden a cada uno de estos grupos.

### 5.2.2 Pesos relativos de los hígados

La siguiente tabla representa el porcentaje de peso promedio que tiene el hígado con respecto al peso corporal total promedio de cada uno de los grupos formados.

El cambio más evidente es para el grupo del control del carcinógeno y para el grupo del astemizol, los cuales destacan por presentar el doble del peso con respecto a los hígados sanos.

**Tabla 4.** Peso relativo de los hígados.

<b>Tratamiento</b>	<b>Peso relativo</b>
DEN 16 sem + 2 sem s/DEN + PBS	6%
Astemizol	6%
Cisplatino	4.8%
Astemizol + cisplatino	3%
Hígado sano	3%

### 5.2.3 Reporte histopatológico de los hígados tratados

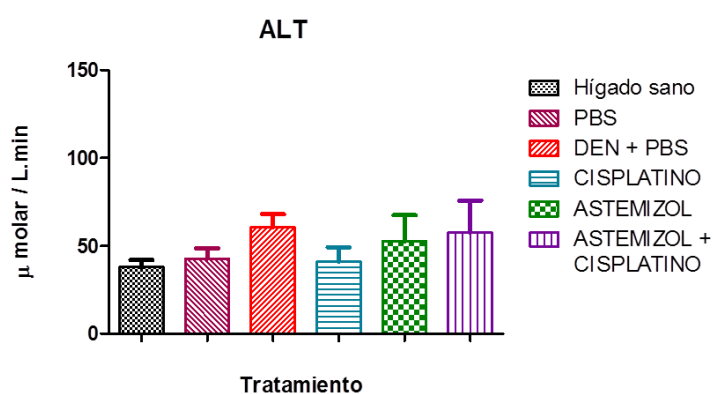
El reporte histopatológico se indica en la tabla 5, la información a destacar es que el grupo control del carcinógeno es compatible con cirrosis, esto es controversial e inesperado ya que se esperaba compatibilidad con carcinoma hepatocelular.

**Tabla 5.** Histopatología de hígados

Tratamiento	Histopatología
Hígado sano	Sin alteraciones histológicas.
PBS	Sin alteraciones histológicas.
DEN+PBS	Compatible con cirrosis, cambios regenerativos leves.
Cisplatino	Carcinoma hepatocelular multifocal, displasia hepatocelular de alto grado focal, cambios regenerativos.
Astemizol	Carcinoma hepatocelular, displasia hepatocelular de alto y bajo grado, cambios regenerativos.
Astemizol + Cisplatino	Carcinoma hepatocelular, displasia hepatocelular de alto grado, cambios regenerativos leves.

#### 5.2.4 Actividad alanino amino transferasa en suero

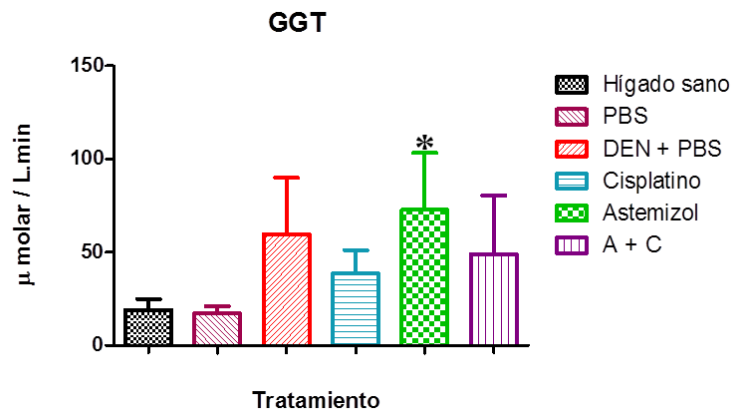
La figura 11 muestra la actividad de la enzima ALT en suero para cada uno de los grupos formados, las barras indican que la actividad es ligeramente mayor para el grupo control del carcinógeno, sin embargo el análisis estadístico no muestra diferencia significativa entre los grupos, lo cual es imprevisto.



**Figura 10.** Actividad enzimática de ALT. La prueba de Tukey's no establece diferencias significativas entre grupos.

### 5.2.5 Actividad gamma glutamil transpeptidasa en suero

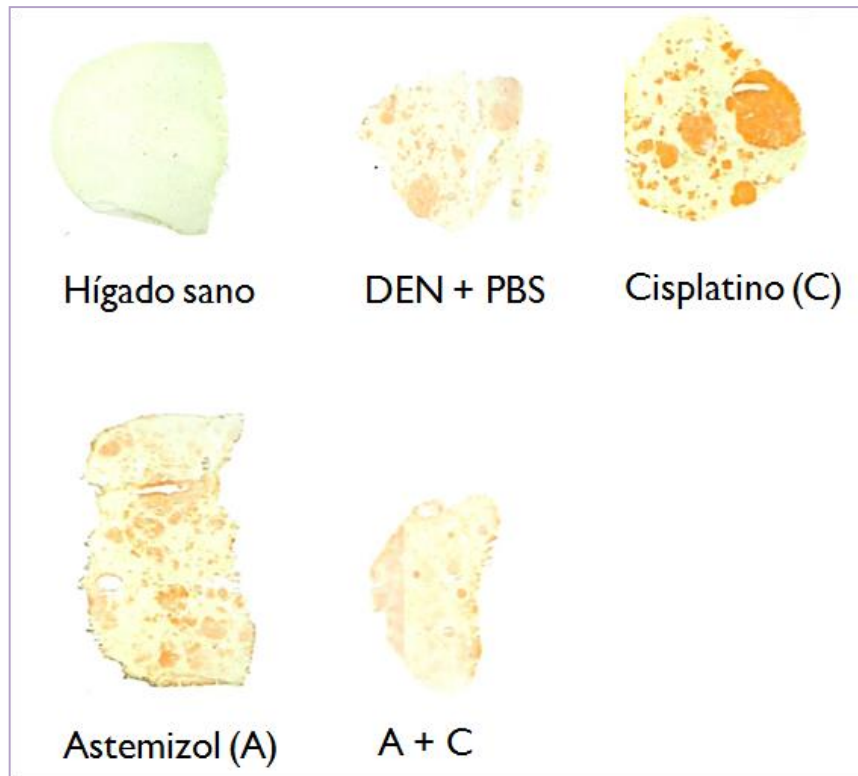
De acuerdo a la figura 12 y contrariamente a lo que se esperaba obtener, el grupo que presenta una mayor actividad de la gamma glutamil transpeptidasa es el grupo correspondiente al astemizol, seguido del control del carcinógeno, así mismo análisis estadístico indica que solo existe significancia entre el grupo de astemizol y el hígado sano.



**Figura 11.** Actividad enzimática de GGT en suero. La prueba de Tukey's indica diferencia significativa entre el grupo de astemizol y el hígado sano.

### 5.2.6 Actividad GGT en tejido hepático

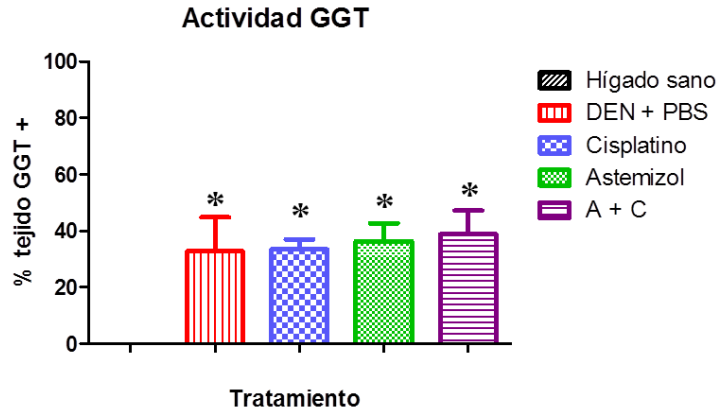
La histoquímica es una técnica que da a conocer la actividad de una enzima por la presencia de un precipitado, para la gamma glutamil transpeptidasa este precipitado es de color rojo. La figura 13 muestra fotografías de rebanadas de hígados correspondientes a cada grupo, y como es de suponerse el hígado sano no presenta actividad de la GGT, no obstante es difícil discernir a simple vista qué corte presenta una mayor actividad.



**Figura 12.** GGT en tejido hepático. Esta figura muestra rebanadas de hígados representativas de cada grupo sometidas a histoquímica para evaluar la actividad de GGT.

La cuantificación de partículas correspondiente a los cortes de hígado esquematizados arriba se observa en la figura 14, la cual indica porcentajes de actividad muy similares, hay diferencia significativa de los grupos tratados con fármacos y el control del carcinógeno con respecto al hígado sano, estos resultados son completamente inesperados.

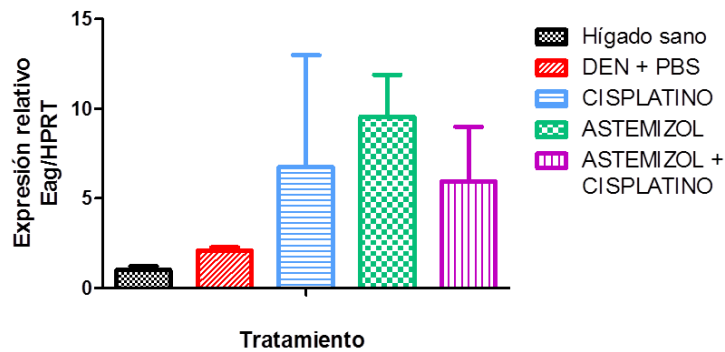




**Figura 13.** Porcentaje de tejido GGT positivo. La prueba de Tukey's indica diferencia significativa entre el grupo de astemizol, cisplatino, astemizol + cisplatino contra el hígado sano.

### 5.2.7 RT-PCR de eag1

La figura 15 indica que hay un aumento en la expresión de eag1 de los grupos tratados farmacológicamente y el control del carcinógeno con respecto al hígado sano. No se presentan diferencias significativas con respecto a la expresión relativa de eag1 para los grupos analizados.



**Figura 14.** Expresión de mRNA de eag1. Esta gráfica representa la expresión relativa del mensajero de eag1 empleando el gen constitutivo HPRT. La prueba de Tukey's no indica diferencias significativas.

## 6.0 DISCUSIÓN

### Efecto antiproliferativo

Como se observa en la figura 9 las células Hep-G2 son muy sensibles al efecto del cisplatino ya que a las concentraciones de 10, 20, 30, 50  $\mu\text{M}$  las células muestran una disminución en proliferación celular muy drástica con respecto al control, esto es casi de 0. Por lo anterior este modelo no puede considerarse adecuado, ya que para aplicar el algoritmo de Chou-Talalay se requiere un comportamiento dosis dependiente. Otro punto a discutir es que para evaluar la combinación de fármacos, el cisplatino no permitiría saber la participación que tiene el astemizol en el efecto combinado, por ello es que se requiere hacer el estudio de interacción de fármacos a concentraciones muy bajas de cisplatino.

Las dosis de cisplatino administradas en pacientes varían dependiendo del tipo y etapa del cáncer, comúnmente las concentraciones alcanzadas en sangre se encuentran alrededor de 11  $\mu\text{M}$ , esta concentración se considera suficiente para generar resistencia al cisplatino. Lo anterior no es comparable con lo que se observa en la figura 9, esto es un argumento más que explica porque el modelo con células HepG2 no es el ideal.

### Efecto antitumoral

Uno de los resultados con gran impacto en este proyecto es el análisis histopatológico, ya que representa una evaluación fidedigna de la afectación de los hígados obtenidos de los diferentes grupos tratados. Como es de predecir los hígados sanos no presentan alteración alguna. En cambio para los hígados correspondientes al control del carcinógeno se indica una compatibilidad con cirrosis, este resultado es completamente inesperado y también controversial ya que se ha demostrado con anterioridad la reproducibilidad del modelo de carcinogénesis hepática con DEN no solo en el propio grupo de trabajo sino también en otros laboratorios, los cuales permiten corroborar que el modelo es el adecuado [60].

Algo muy extraño es que los hígados pertenecientes a los grupos tratados farmacológicamente tienen un diagnóstico de compatibilidad con carcinoma hepatocelular, aparte de displasia hepatocelular y cambios regenerativos. Posiblemente este diagnóstico se deba a que realmente se logró producir el cáncer, no obstante los tratamientos farmacológicos se administraron solo por dos semanas lo que tal vez pudo evitar que el efecto de los fármacos fuera evidente. Las consideraciones iniciales para este proyecto eran dar tratamiento farmacológico durante cuatro semanas, ya que se cuenta con reportes previos que comprueban la efectividad del astemizol como agente anticancerígeno en modelos *in vivo* tras su administración durante cuatro semanas. Sin embargo la mortalidad de las ratas aumento drásticamente y se tomó la decisión de acortar los tratamientos.

Con respecto a la actividad enzimática: La enzima alanino amino transferasa es principalmente un marcador de daño hepático, la importancia en este proyecto fue la premisa de que la mayoría de los pacientes con carcinoma hepatocelular tienen el antecedente de cirrosis, por tanto es importante tener un monitoreo adecuado de la función hepática. Alternativamente niveles excesivamente elevados de esta enzima indican la presencia de carcinoma hepatocelular [61-62]. En relación a los resultados obtenidos, claramente no existe significancia estadística, pero se puede observar que la mayor actividad es presentada por el grupo control del carcinógeno, esto de alguna manera pudiera estar relacionado con el estado de cirrosis de acuerdo al análisis histopatológico.

La enzima gamma glutamil transpeptidasa es conocida como marcador de lesiones preneoplásicas, su actividad se ve elevada como un mecanismo de detoxificación, nuevamente en los resultados, los valores obtenidos en tejido son semejantes. En relación a los datos obtenidos para la determinación en suero el grupo de astemizol resulta en una diferencia significativa con relación al grupo de hígados sanos, lo que es comparable con lo reportado en el análisis histopatológico. Los resultados obtenidos para ambas determinaciones de GGT, tanto en suero como en tejido no muestran una evidente relación, esto puede ser debido a que en suero existen algunos factores que pueden estar afectando la actividad de esta enzima, como un aporte de la misma por parte de otros tejidos

como el páncreas, que de manera normal presenta una actividad de GGT basal. [63-64].

### Expresión del canal eag1 a nivel de mRNA

Los resultados obtenidos para esta parte del proyecto empatan correctamente con el reporte histopatológico y reportes anteriores, en los cuales la expresión del canal oncogénico eag1 va en aumento conforme a la progresión del cáncer. En carcinoma hepatocelular (grupos de cisplatino, astemizol y astemizol + cisplatino) la expresión de mRNA de eag1 se encuentra elevada, no así para el grupo control del carcinógeno que en realidad es una condición de cirrosis [60].

Puntualizando en que la mortalidad incrementada de los animales repercutió fuertemente en este proyecto es interesante analizar algunos puntos que permiten identificar al principal factor causal.

Todo acusa a las condiciones bajo las que se encuentran los animales de experimentación en el bioterio, a través de comunicación informal nos hemos enterado de algunos inconvenientes al tratar con animales por ejemplo; infesta con parásitos intestinales principalmente, seguido de pérdida de equilibrio acompañado de un comportamiento al caminar de lado y con la cabeza inclinada, además se ha detectado que el agua de beber no siempre es agua limpia y esto tiene grandes implicaciones debido a que el agua de bebida es considerado como un vector infeccioso muy importante ya que los animales la contaminan con saliva, heces, pelo, cama, alimento. Un factor que puede contribuir con la aparición de parásitos es el cambio de cama, ya que es el vector más común de ectoparásitos.

El hecho de trabajar con animales de experimentación involucra un alto grado de variabilidad, por ello es necesaria la disponibilidad de animales con una alta calidad genética y microbiológica ya que la confiabilidad de los resultados depende en gran medida de ello.

Es necesario que en el bioterio se establezcan parámetros de calidad principalmente de carácter higiénico sanitario más estrictos, esto para mejorar el nivel de experimentación animal.

Algunas medidas a consideración de ser tratadas con el personal del bioterio son:

- Evitar la acumulación de polvo y microorganismos patógenos,
- Renovar el agua en forma total diariamente, los bebederos se limpiarán y se desinfectarán de manera regular.
- Lavar y desinfectar todas las jaulas.
- Realizar cambios de cama tan seguida como sea posible.

Algunas recomendaciones para el uso futuro de animales de laboratorio son realizar una evaluación previa para asegurar la calidad de los animales, esta evaluación puede consistir de:

- Pruebas parasitológicas
- Pruebas Microbiológicas
- Pruebas Histopatológicas
- Pruebas Serológicas

## 7.0 CONCLUSIONES

El empleo de las células Hep-G2 no representa un buen modelo para evaluar interacción farmacológica con cisplatino a las concentraciones alcanzadas de este fármaco en suero de pacientes.

El efecto antitumoral *in vivo* fue afectado por factores ajenos al modelo por lo que es necesario implementar un control de calidad adecuado del estado de salud de los animales previo al estudio.

## 8.0 PERSPECTIVAS

Algunas perspectivas para los ensayos *in vitro* son optar por modelos que permitan una evaluación del efecto de la combinación astemizol y cisplatino, por ejemplo ajustar las concentraciones de cisplatino a una menor concentración, así mismo buscar modelos que traten de imitar mejor lo que ocurre en la clínica.

Relacionado al modelo *in vivo* es necesario desarrollar el modelo de hepatocarcinogénesis considerando un tamaño de muestra inicial mayor, también dar tratamiento farmacológico con una duración de cuatro semanas posteriores a la inducción del cáncer.

## 9.0 REFERENCIAS

1. Ruddon, R.W., *Cancer Biology* ed. O.U. Press. 2007.
2. Hanahan, D. and Robert A. Weinberg, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.
3. Ramzi, S., ROBBINS, and L. Stanley, *Patología humana.*, ed. e. Interamericana. 1995, México.
4. Alberts, B., et al., *Biología Molecular de la Célula* ed. e.E. Omega.
5. Society, A.C. *Cáncer de hígado*. 2012 [cited 2013 Junio]; Available from: <http://www.cancer.org/Espanol/cancer/Cancerdehigado/Guiadetallada/cancer-de-higado-early-detection>.
6. *Globocan 2008* Available from: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>.
7. El-Serag, H.B. and K.L. Rudolph, *Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis*. Gastroenterology, 2007. **132**(7): p. 2557-76.
8. Bosch, F.X., et al., *Primary liver cancer: Worldwide incidence and trends*. Gastroenterology, 2004. **127**(5): p. S5-S16.
9. 2008, G., *Epidemiología del carcinoma hepatocelular en México*
10. Waly Raphael, S., Z. Yangde, and C. Yuxiang, *Hepatocellular carcinoma: focus on different aspects of management*. ISRN Oncol, 2012. **2012**: p. 421673.
11. Oncology, E.S.f.M. *Cáncer de hígado: Una guía para pacientes*. Available from: <http://www.esmo.org/content/download/6612/115091/file/ESMO-RCT-Cancer-de-Higado-Guia-para-Pacientes.pdf>.
12. Méndez Sánchez, N. and M. Uribe Esquivel, *Conceptos actuales en hepatología*, ed. M. Doyma. 2003.
13. Uribe Esquivel, M., et al., *Carcinoma hepatocelular*. Revista de Gastroenterología de México, 2010. **75**: p. 168-176.
14. Aravalli, R.N., E.N. Cressman, and C.J. Steer, *Cellular and molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma: an update*. Arch Toxicol, 2013. **87**(2): p. 227-47.
15. Forner, A., et al., *Diagnóstico y tratamiento del carcinoma hepatocelular*. Medicina Clínica, 2008. **132**(7): p. 272-287.
16. *Estadísticas trasplante* Available from: [http://www.cenatra.salud.gob.mx/interior/trasplante\\_estadisticas.html](http://www.cenatra.salud.gob.mx/interior/trasplante_estadisticas.html).
17. Acuña Tovar, M. and E. Roman Bassaure. *Cáncer de hígado*. 2013; Available from: [http://www.hgm.salud.gob.mx/descargas/pdf/area\\_medica/onco/guias/cancer\\_Higado.pdf](http://www.hgm.salud.gob.mx/descargas/pdf/area_medica/onco/guias/cancer_Higado.pdf).
18. Camacho, J., *Ether a go-go potassium channels and cancer*. Cancer Lett, 2006. **233**(1): p. 1-9.
19. Curtis, H. and N. Sue Barnes, *Biología*, ed. E.M. Panamericana. 2000.
20. Pardo, L.A., *Voltage-gated potassium channels in cell proliferation*. Physiology (Bethesda), 2004. **19**: p. 285-92.
21. Kaplan, W.D. and W.E. Trout, 3rd, *The behavior of four neurological mutants of Drosophila*. Genetics, 1969. **61**(2): p. 399-409.
22. Rodríguez-Rasgado, J.A., I. Acuna-Macias, and J. Camacho, *Eag1 channels as potential cancer biomarkers*. Sensors (Basel), 2012. **12**(5): p. 5986-95.
23. Napp, J. 2003.



24. Bauer, C.K. and J.R. Schwarz, *Physiology of EAG K<sup>+</sup> channels*. J Membr Biol, 2001. **182**(1): p. 1-15.
25. Hemmerlein, B., et al., *Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours*. Mol Cancer, 2006. **5**: p. 41.
26. Pardo, L.A., et al., *Oncogenic potential of EAG K(+) channels*. EMBO J, 1999. **18**(20): p. 5540-7.
27. Downie, B.R., et al., *Eag1 expression interferes with hypoxia homeostasis and induces angiogenesis in tumors*. J Biol Chem, 2008. **283**(52): p. 36234-40.
28. Garcia-Becerra, R., et al., *Calcitriol inhibits Ether-a go-go potassium channel expression and cell proliferation in human breast cancer cells*. Exp Cell Res, 2010. **316**(3): p. 433-42.
29. Diaz, L., et al., *Estrogens and human papilloma virus oncogenes regulate human ether-a-go-go-1 potassium channel expression*. Cancer Res, 2009. **69**(8): p. 3300-7.
30. Farias, L.M., et al., *Ether a go-go potassium channels as human cervical cancer markers*. Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 6996-7001.
31. Ortiz, C.S., et al., *Eag1 potassium channels as markers of cervical dysplasia*. Oncol Rep, 2011. **26**(6): p. 1377-83.
32. Drug Bank Astemizole. [cited 2013 Octubre ]; Available from: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00637>.
33. Garcia-Quiroz, J. and J. Camacho, *Astemizole: an old anti-histamine as a new promising anti-cancer drug*. Anticancer Agents Med Chem, 2011. **11**(3): p. 307-14.
34. Garcia-Ferreiro, R.E., et al., *Mechanism of block of hEag1 K<sup>+</sup> channels by imipramine and astemizole*. J Gen Physiol, 2004. **124**(4): p. 301-17.
35. Roy, J., et al., *Pharmacological separation of hEAG and hERG K<sup>+</sup> channel function in the human mammary carcinoma cell line MCF-7*. Oncol Rep, 2008. **19**(6): p. 1511-6.
36. Garcia-Quiroz, J., et al., *Astemizole synergizes calcitriol antiproliferative activity by inhibiting CYP24A1 and upregulating VDR: a novel approach for breast cancer therapy*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e45063.
37. Ishikawa, M., et al., *Reversal of acquired resistance to doxorubicin in K562 human leukemia cells by astemizole*. Biol Pharm Bull, 2000. **23**(1): p. 112-5.
38. Fernández Águila, J., et al., *Resistencia a drogas mediada por la glicoproteína P*. Revista Cubana de Oncología, 1998. **14**(2): p. 111-120.
39. Parsons, M.E. and C.R. Ganellin, *Histamine and its receptors*. Br J Pharmacol, 2006. **147** Suppl 1: p. S127-35.
40. Bolton, E., J. King, and D.L. Morris, *H<sub>2</sub>-antagonists in the treatment of colon and breast cancer*. Semin Cancer Biol, 2000. **10**(1): p. 3-10.
41. Lampiasi, N., et al., *Histamine and spontaneously released mast cell granules affect the cell growth of human hepatocellular carcinoma cells*. Exp Mol Med, 2007. **39**(3): p. 284-94.
42. Cricco, G.P., et al., *Histamine regulates pancreatic carcinoma cell growth through H<sub>3</sub> and H<sub>4</sub> receptors*. Inflamm Res, 2008. **57** Suppl 1: p. S23-4.
43. Cricco, G., et al., *Human pancreatic carcinoma cell line Panc-1 and the role of histamine in growth regulation*. Inflamm Res, 2000. **49** Suppl 1: p. S68-9.
44. Hegyesi, H., et al., *Suppression of melanoma cell proliferation by histidine decarboxylase specific antisense oligonucleotides*. J Invest Dermatol, 2001. **117**(1): p. 151-3.
45. Jiang, C.G., et al., *Cimetidine induces apoptosis in gastric cancer cells in vitro and inhibits tumor growth in vivo*. Oncol Rep, 2010. **23**(3): p. 693-700.

46. Blaya, B., et al., *Histamine and histamine receptor antagonists in cancer biology*. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2010. **9**(3): p. 146-57.
47. Caffaratti , M. and M.C. Briñón *Astemizol y terfenadina. Advertencia sobre su uso* 2003 [cited 2013 Octubre]; Available from: <http://www.fcq.unc.edu.ar/cime/astemizol.htm>.
48. Okada, S., et al., *A phase 2 study of cisplatin in patients with hepatocellular carcinoma*. *Oncology*, 1993. **50**(1): p. 22-6.
49. *Drug Bank, Cisplatin*. [cited 2013 Octubre]; Available from: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00515>.
50. Lee, J.O., et al., *Combination chemotherapy with capecitabine and cisplatin for patients with metastatic hepatocellular carcinoma*. *Ann Oncol*, 2009. **20**(8): p. 1402-7.
51. Ikeda, M., et al., *A phase II trial of continuous infusion of 5-fluorouracil, mitoxantrone, and cisplatin for metastatic hepatocellular carcinoma*. *Cancer*, 2005. **103**(4): p. 756-62.
52. Parikh, P.M., et al., *A phase II study of gemcitabine and cisplatin in patients with advanced hepatocellular carcinoma*. *Trop Gastroenterol*, 2005. **26**(3): p. 115-8.
53. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. *J Immunol Methods*, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
54. Farber, E., *The multistep nature of cancer development*. *Cancer Res*, 1984. **44**(10): p. 4217-23.
55. Verna, L., J. Whysner, and G.M. Williams, *N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation*. *Pharmacol Ther*, 1996. **71**(1-2): p. 57-81.
56. Schiffer, E., et al., *Gefitinib, an EGFR inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis*. *Hepatology*, 2005. **41**(2): p. 307-14.
57. Reitman, S. and S. Frankel, *A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases*. *Am J Clin Pathol*, 1957. **28**(1): p. 56-63.
58. Glossmann, H. and D.M. Neville, *gamma-Glutamyltransferase in kidney brush border membranes*. *FEBS Lett*, 1972. **19**(4): p. 340-344.
59. Rutenburg, A.M., et al., *Histochemical and ultrastructural demonstration of gamma-glutamyl transpeptidase activity*. *J Histochem Cytochem*, 1969. **17**(8): p. 517-26.
60. Chávez-López, M.d.G., *Efecto del astemizol en células de cáncer cervical y en modelos de cáncer hepático*, in *Farmacología*. 2013, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN: México.
61. Tarao, K., et al., *Association between high serum alanine aminotransferase levels and more rapid development and higher rate of incidence of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus-associated cirrhosis*. *Cancer*, 1999. **86**(4): p. 589-95.
62. Tarao, K., et al., *Relationship between the recurrence of hepatocellular carcinoma (HCC) and serum alanine aminotransferase levels in hepatectomized patients with hepatitis C virus-associated cirrhosis and HCC*. *Cancer*, 1997. **79**(4): p. 688-94.
63. Marie, H., C. Hanigan, and H. C., *Gamma-glutamyl transpeptidase - its role in hepatocarcinogenesis*. *Carcinogenesis*, 1985. **6**(2): p. 165-172.

64. Pompella, A., et al., *Expression of gamma-glutamyltranserase in cancer cells and its significance in drug resistance*. *Biochemical pharmacology*, 2006. **71**: p. 231-238.