



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“Efecto del Astemizol en Células de Cáncer Cervical y en
Modelos de Cáncer Hepático”**

T E S I S

Que presenta

M. en C. MARÍA DE GUADALUPE CHÁVEZ LÓPEZ

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

Directores de Tesis:

Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo

Dr. Patricio Gariglio Vidal.

México, D.F.

ABRIL, 2014

INDICE

Resumen	5
Abstract	7
1. Introducción	9
1.2 Cáncer Cervical.....	9
1.3 Cáncer Hepático.....	11
1.4 Canales Iónicos.....	13
1.5 Canales de Potasio.....	15
1.6 Canales de Potasio Éter à go-go (Eag).....	17
1.7 Canales Eag1 y el Cáncer.....	21
1.8 Eag1 como Marcador Tumoral Temprano.....	24
1.9 Eag1 como Blanco Terapéutico en Cáncer.....	26
1.10 Astemizol.....	28
2. Justificación	30
3. Hipótesis	31

4. Objetivos	31
4.1 Objetivo General.....	31
4.2 Objetivos Específicos.....	32
5. Materiales y Métodos	33
5.1 Líneas Celulares y Reactivos.....	33
5.2 Inmunocitoquímica.....	33
5.3 Actividad Metabólica (ensayo MTT).....	34
5.4 Apoptosis.....	35
5.5 Animales y Tratamiento.....	36
5.6 Histología e Inmunohistoquímica.....	38
5.7 PCR en Tiempo Real.....	39
5.8 Análisis Estadístico.....	40
6. Resultados	41
6.1 El Astemizol Disminuye la Viabilidad Celular en Células de Cáncer Cervical.....	41
6.2 El Astemizol Induce Apoptosis en Células de Cáncer Cervical.....	42
6.3 El Astemizol Disminuye la Viabilidad Celular e Induce Apoptosis en las Celulas de Cáncer Hepático que Expresan Eag1.....	43

6.4 Efecto Preventivo y Terapéutico del Astemizol en un Modelo <i>in vivo</i> de CHC.....	45
6.5 Eag1 como Potencial Marcador Temprano de CHC.....	49
7. Discusión.....	52
8. Resumen de Resultados.....	60
9. Conclusiones.....	61
10. Referencias.....	61

RESUMEN

El cáncer cervical es una de las mayores causas de muerte en las mujeres principalmente en países en desarrollo. Mientras que el cáncer hepatocelular es la quinta causa de muerte por cáncer alrededor del mundo. Por lo anterior es importante mejorar los métodos de diagnóstico y encontrar nuevos blancos terapéuticos para estas enfermedades.

El astemizol, un fármaco antihistamínico, se ha propuesto como un nuevo agente anti-cancerígeno, el cual tiene como blanco varias proteínas implicadas en el cáncer incluyendo el canal de potasio Eag1. Eag1 se ha sugerido como un marcador tumoral temprano y blanco terapéutico antineoplásico en varios tipos de cáncer, sin embargo; el efecto del astemizol en las células del cáncer cervical, del cáncer hepático y en modelos *in vivo* de carcinoma hepatocelular (CHC) es desconocido. En este trabajo se investigó el efecto del astemizol en la viabilidad celular y la apoptosis de las células del cáncer cervical y cáncer hepático, así como en un modelo de hepatocarcinogénesis química en rata.

El efecto citotóxico del astemizol se estudió en las líneas celulares de cáncer cervical (HeLa, SiHa, CaSki, INBL y C-33A), así como de cáncer hepático (HepG2). Se determinó la viabilidad celular mediante el método MTT y la apoptosis se determinó

mediante citometría de flujo (por el método de anexinaV). El astemizol provocó la disminución de la viabilidad celular y el aumento de la apoptosis en todas las líneas celulares estudiadas con significancia estadística ($p < 0,05$).

También se evaluó el efecto del astemizol en un modelo de CHC inducido con dietilnitrosamina (DEN) en rata. Este protocolo tiene la característica de inducir cirrosis a las 12 semanas y el desarrollo de CHC multifocal en 18 semanas. El astemizol previno el desarrollo de tumores. El mRNA de Eag1 se incrementó en la mayoría de los grupos tratados con DEN, pero disminuyó después del tratamiento con astemizol. La proteína de Eag1 se detectó en los hígados cirróticos y con displasia. Nuestros resultados proponen al astemizol como una posible terapia para el cáncer cervical, además de sugerir el uso del mismo para la prevención y el tratamiento de CHC, así como también, al canal Eag1 como posible marcador temprano de CHC.

ABSTRACT

Cervical cancer is a major cause of mortality among women in developing countries and hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth most common cancer and the third leading cause of cancer mortality in the world. Thus, new cancer treatments are necessary.

Astemizole has been proposed as a novel anticancer agent targeting several proteins involved in cancer including Eag1 potassium channels. Eag1 has been suggested as a tumor marker and antineoplastic therapeutic target. However, the effect of astemizole on cervical, liver cancer cells and HCC model *in vivo* is unknown. Therefore, we investigated the effect of astemizole on the proliferation and apoptosis of cervical and liver cancer cells as well as on an HCC *in vivo* model.

Cervical cancer cell lines (HeLa, SiHa, CaSki, INBL and C-33A) and the liver cancer cell line HepG2 were cultured. Cell proliferation was assayed with the MTT method, and apoptosis was investigated by flow cytometry. Astemizole significantly ($P < 0.05$) decreased cell proliferation and increased apoptosis in all the cell lines studied.

In the HCC rat model induced with diethylnitrosamine (DEN), that model causes cirrhosis in 12 weeks and multifocal HCC in 18 weeks, astemizole clearly

prevented tumor development. Eag1 mRNA was increased in most diethylnitrosamine-treated groups, but decreased after astemizole treatment. Channel protein was detected in cirrhotic and dysplastic livers.

Our results suggest astemizole as a potential therapy for cervical cancer. In addition, we suggest astemizole for HCC prevention and treatment, and Eag1 channels as potential early HCC markers.

1. INTRODUCCIÓN.

El cáncer es una enfermedad caracterizada por la proliferación descontrolada de las células; existen factores de nuestro estilo de vida que aumentan el riesgo de varios tipos de cáncer. En general el cáncer no es hereditario, aunque existen factores genéticos que hacen susceptibles a las personas a padecerlo (Xu et. al., 2013), es provocado por diversos factores medioambientales, los cuales ocasionan mutaciones en algunos genes, lo que lleva a la transformación maligna de las células. En los últimos años, se han llevado a cabo diversos estudios respecto al tema con la finalidad de conocer mejor los genes, las proteínas y los procesos que controlan el ciclo celular, la apoptosis y la diferenciación celular, lo que permite entender mejor esta patología y obtener nuevas estrategias para combatirla (Gariglio, 2003).

1.2 Cáncer Cervical.

El cáncer cervino-uterino (CaCu) es un gran problema de salud y se sabe que el principal factor de riesgo para el desarrollo de esta patología es la infección por virus del papiloma humano de alto riesgo (HR-HPV por sus siglas en inglés) (Gariglio, 2003).

Los HR-HPV favorecen la proliferación celular e inhiben los mecanismos de apoptosis. El virus es capaz de integrar su genoma al de la célula y favorecer así la expresión de las oncoproteínas E6 y E7, las cuales, por medio de la inactivación de proteínas supresoras de tumores como son p53 y Rb (además de interactuar con otros blancos independientes de p53 y Rb), son capaces de inmortalizar cultivos primarios de queratinocitos humanos y transformarlos con la ayuda del oncogén ras (Zur-Hausen, 2002). Sin embargo, se necesitan otros factores para que se desarrolle un tumor maligno además de la infección viral entre los que se encuentran los estrógenos. Es importante señalar que en mujeres no infectadas con HR-HPV los estrógenos no son factor de riesgo para el desarrollo de cáncer cervical (Brake y Lambert, 2005).

Los estrógenos juegan un papel muy importante en el desarrollo y el mantenimiento de las funciones sexuales y reproductivas, ya que tanto en los hombres como en las mujeres ejercen una gran variedad de efectos biológicos (Brake y Lambert, 2005).

Se han descrito principalmente dos tipos de receptores de estrógenos, el ER α y el ER β . Estos receptores pertenecen a la familia de los receptores nucleares que funcionan como factores de transcripción. Se ha descrito que los ER α y ER β pueden tener acciones opuestas en los promotores de algunos genes, particularmente aquellos involucrados en la proliferación celular, lo que sugiere que la respuesta proliferativa al estradiol es el resultado de un balance entre la señalización del ER α y el ER β . Con el fin de modular farmacológicamente las actividades de los ER α y ER β se

han obtenido diversos antagonistas de estos receptores, sin embargo, se ha observado que algunos de estos antiestrógenos tienen funciones contrarias, dependiendo del tejido sobre el que actúen, es decir, en un tejido pueden actuar como antagonistas, pero en otro como agonistas (Heldring et. al., 2007).

El cáncer cervical es curable siempre y cuando sea detectado a tiempo. Para estadios tempranos, el tratamiento de elección es la cirugía, con una alta probabilidad de éxito. En etapas avanzadas de la enfermedad, desafortunadamente hay poco que hacer, los tratamientos consisten de quimio y radioterapias, las cuales la mayoría del tiempo solo funcionan de manera paliativa (Denny, 2012).

El cáncer cervical es una de las principales causas de muerte por cáncer entre las mujeres, especialmente en los países en desarrollo (Franco et. al., 2001, WHO), esto se debe principalmente a la detección tardía de la enfermedad pero sobre todo a las terapias poco efectivas en los estadios avanzados, por lo que son necesarias nuevas alternativas terapéuticas.

1.3 Cáncer Hepático.

Existen varios tipos de cáncer hepático dependiendo del tipo celular, como los colangiocarcinomas, los angiosarcomas, el hepatoblastoma y el cáncer hepatocelular (El-Serag y Rudolph, 2007).

De los cánceres primarios de hígado, del 85 al 95% corresponden al cáncer hepatocelular (HCC) (El-Serag y Rudolph, 2007); que ocupa el quinto lugar en todo el mundo (Globocan, 2008) y además, es la tercera causa de mortalidad por cáncer (Globocan, 2008, Parkin, 2000).

Existen numerosos factores de riesgo para el desarrollo de HCC, entre los cuales se encuentran la raza, siendo más susceptibles las personas asiáticas, la edad ya que las personas con más riesgo son las que sobrepasan los 65 años, el género debido a que los hombres presentan una mayor incidencia con respecto a las mujeres, los factores alimenticios como el abuso en el alcohol y el consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas, y la obesidad, entre otros. Sin embargo, los factores de riesgo más contundentes son la infección crónica con el virus de la hepatitis B o C y por lo general cualquier factor que lleve al desarrollo de la cirrosis, debido a que éste es el principal factor de riesgo para el desarrollo del cáncer hepático (El-Serag y Rudolph, 2007, Altekruse et. al., 2009).

Por lo general, el cáncer hepatocelular tiene un mal pronóstico debido a que no responde a los tratamientos existentes, ya que cuando éste es detectado se encuentra en una fase muy avanzada de la enfermedad y lo único que se administra son tratamientos paliativos (El-Serag y Rudolph, 2007, Schiffer et. al., 2005, Befeler y Bisceglie, 2002). Por lo anterior, es necesario el desarrollo de nuevos métodos de detección temprana para esta enfermedad, así como nuevos blancos terapéuticos efectivos para etapas tanto tempranas como avanzadas del cáncer hepatocelular.

1.4 Canales Iónicos.

Los canales iónicos representan una nueva alternativa como elementos de diagnóstico temprano y blancos terapéuticos para diversos tipos de cáncer.

Los canales iónicos son proteínas transmembranales que controlan el paso de los iones y ayudan a mantener el gradiente electroquímico a través de la membrana de toda célula viva (Figura 1). Estos canales actúan como compuertas que se cierran o se abren en función de los estímulos externos y además, son capaces de diferenciar qué iones pasan a través de ellos, es decir, presentan selectividad iónica. Existen canales de potasio, calcio, sodio y cloruro, los cuales se encuentran implicados en una amplia gama de procesos fisiológicos como la excitación nerviosa y muscular, la transducción sensorial, la proliferación y el metabolismo celular, entre otros (Hille, 2001). Por lo anterior, se ha observado que alteraciones en estos canales pueden llevar al desarrollo de múltiples enfermedades conocidas como canalopatías (Martínez, 2004).

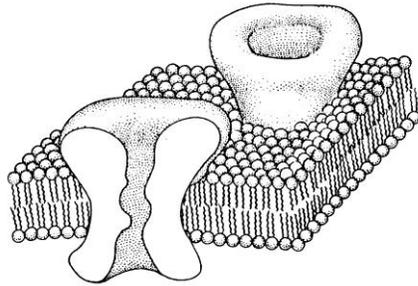


Figura 1. *Canales iónicos.* Esquema de la estructura y ubicación en la membrana celular (Hille, 2001).

Los canales iónicos pueden presentar una de las tres diferentes conformaciones, abierto (conductora), cerrado ó inactivado (no conductora) (Figura 2). De esta manera, dependiendo del estímulo que provoca la apertura del canal, se pueden clasificar en diferentes tipos: canales dependientes de voltaje, canales activados por ligando, canales mecanosensibles y canales activados por temperatura (Hille, 2001, Tamargo, 2004).

Existe una gran variedad de canales dependientes de voltaje entre los cuales tenemos a los de potasio (*Kv*).

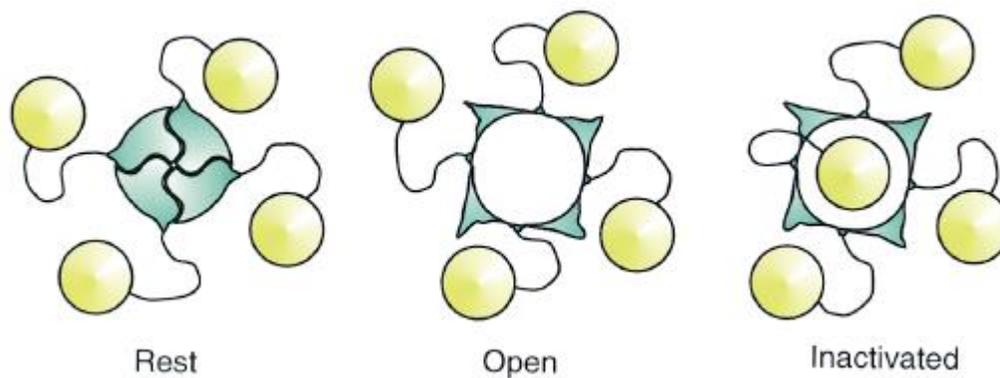


Figura 2. *Estados conformacionales de los canales iónicos.* Cuando la célula está en reposo el canal se encuentra cerrado (izquierda), frente a un estímulo el canal se abre (centro) y finalmente una de las 4 esferas de inactivación lo inactiva (derecha). (Armstrong y Hille 1998).

1.5 Canales de Potasio.

Los canales de potasio dependientes de voltaje están formados por cuatro subunidades α , cada subunidad consta de seis segmentos transmembranales (S1-S6), además, de una región N-terminal y C-terminal localizadas citoplásmicamente; poseen también una región de poro que se encuentra entre el segmento S5 y S6 el cual es altamente selectivo para potasio. Al segmento S4 se le ha considerado como el sensor de voltaje gracias a que contiene una gran densidad de aminoácidos cargados positivamente (Figura 3a); de esta manera, cuando se da un cambio en el potencial de la membrana, éste es sentido por el segmento S4, provocando su translocación, lo que

lleva a un cambio conformacional en el canal y con esto, a la apertura del mismo permitiendo el paso de potasio a través del mismo (Figura 3b) (Heinemann y Solveig, 2001).

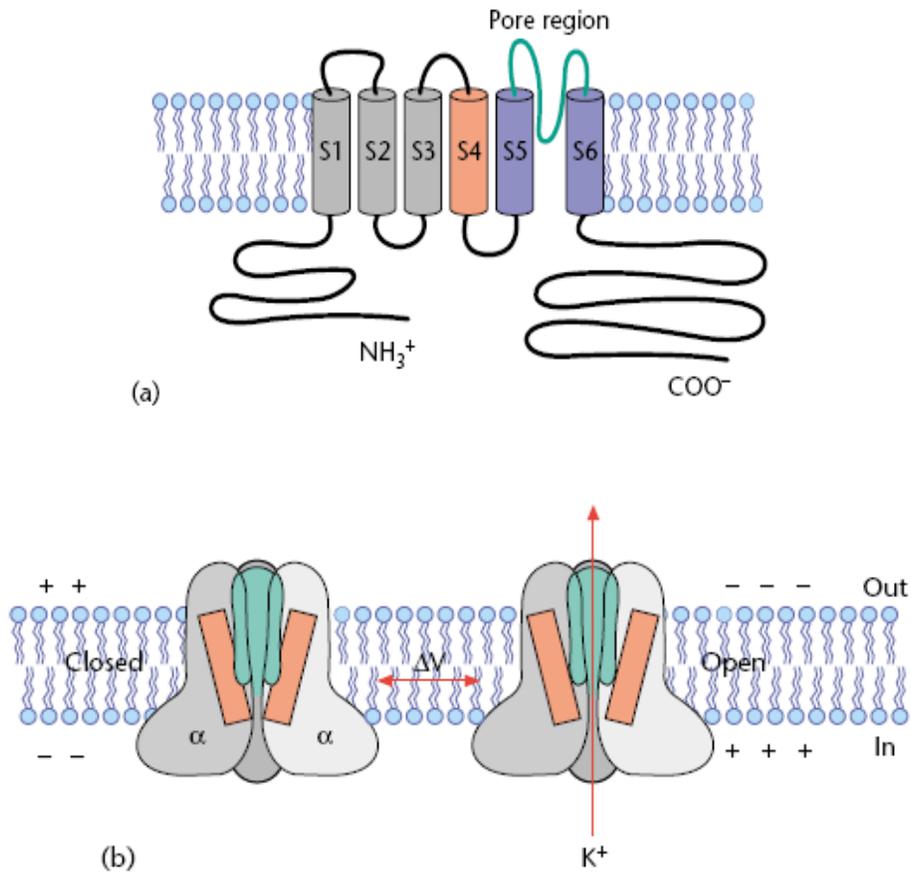


Figura 3. Subunidad α de los canales de potasio activados por voltaje. a) Cada subunidad posee 6 segmentos transmembranales, un sensor de voltaje (S4), una región de poro selectiva para potasio (entre S5 y S6) y regiones amino y carboxilo terminal hacia la región del citoplasma. b) Arreglo de las subunidades y apertura del canal, poro (en verde), sensor de voltaje (en rosa) que al translocarse provoca la apertura del canal y el flujo de potasio (Heinemann y Solveig, 2001).

Existe una gran variedad de familias de canales de potasio y dentro de todas ellas encontramos a la familia de canales de potasio Eag1 (Éter à go-go), la cual ha tomado mucha importancia debido a su participación en la proliferación celular y a su elevada expresión en diferentes tipos de cáncer (Pardo, 2004).

1.6 Canales de Potasio Éter à go-go (Eag).

La familia de canales de potasio Eag se llama así debido a que a finales de la década de 1960 se estaba experimentando con mutantes de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, y se descubrió que con cierta mutación y posterior anestesia con éter las moscas presentaban un fenotipo característico, el cual era un movimiento pausado y rítmico de sus patas, lo que asemejaba un baile à-go-go, de aquí que se nombrara Éter à go-go al locus mutado responsable de este fenotipo (Kaplan et. al, 1969). Años más tarde, se descubrió que dicho locus codificaba para una familia de canales de potasio. Este descubrimiento fue seguido de la identificación de tres diferentes subfamilias: *Eag*, *Erg* (gene relacionado con Eag) y *Elk* (canal de K⁺ parecido a Eag); años más tarde fueron clonados todos los miembros de las subfamilias identificando dos para Eag (Eag1 y Eag2), tres para Erg (Erg1, Erg2 y Erg3) y tres para Elk (Elk1, Elk2 y Elk3) (Bauer y Schwarz, 2001) (Figura 4b).

Como para otros canales de potasio activados por voltaje, se ha propuesto que los canales Eag están formados por el ensamble de cuatro subunidades α , cada una de ellas consta de seis segmentos transmembranales (S1-S6); al segmento S4 se le ha considerado como el sensor de voltaje y la región del poro se localiza entre los segmentos S5 y S6, el cual es altamente selectivo para potasio. Cada subunidad α posee un extremo amino y un carboxilo terminal hacia el interior de la célula, en donde se han encontrado características de suma importancia como un dominio PAS (Per-Arnt-Sim) en la región amino, el cual es un sensor de oxígeno en varias proteínas; así también, se ha encontrado en la región carboxilo un dominio de unión a nucleótidos cíclicos (cNBD), una secuencia de unión a calcio-calmodulina (CaM), una secuencia de tetramerización para la unión de las cuatro subunidades α (TCC) y algo muy interesante, es que se ha encontrado una secuencia de localización nuclear (NLS) (Figura 4a) (Bauer y Schwarz, 2001, Napp, 2003). Además de estos dominios, se ha encontrado un dominio de unión a la proteína epsina, la cual se sabe que está involucrada en la internalización de receptores para factores de crecimiento.

Una de las características electrofisiológicas importantes de los canales Eag1 es que tienen una corriente de activación lenta y que ésta no se inactiva frente a una despolarización sostenida (Figura 4c); además, a pre-pulsos más negativos, el canal presenta una corriente de activación más lenta; a este fenómeno se le conoce como efecto Cole-More (también lo presenta Eag2), el cual se acentúa aún más con concentraciones crecientes de magnesio (Figura 5) (Bauer y Schwarz, 2001).

La expresión del canal Eag1 (principal miembro de la familia Eag implicado en cáncer) se ha encontrado muy limitada en el tejido sano, y de manera muy interesante se ha encontrado una alta expresión en los diferentes tipos de cáncer y líneas tumorales, por lo que se le ha sugerido un importante papel en la proliferación celular y la transformación maligna de las células (Hemmerlein et. al., 2006, Pardo et. al., 1999).

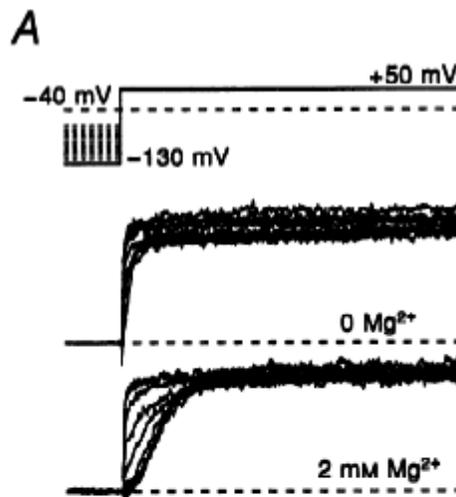
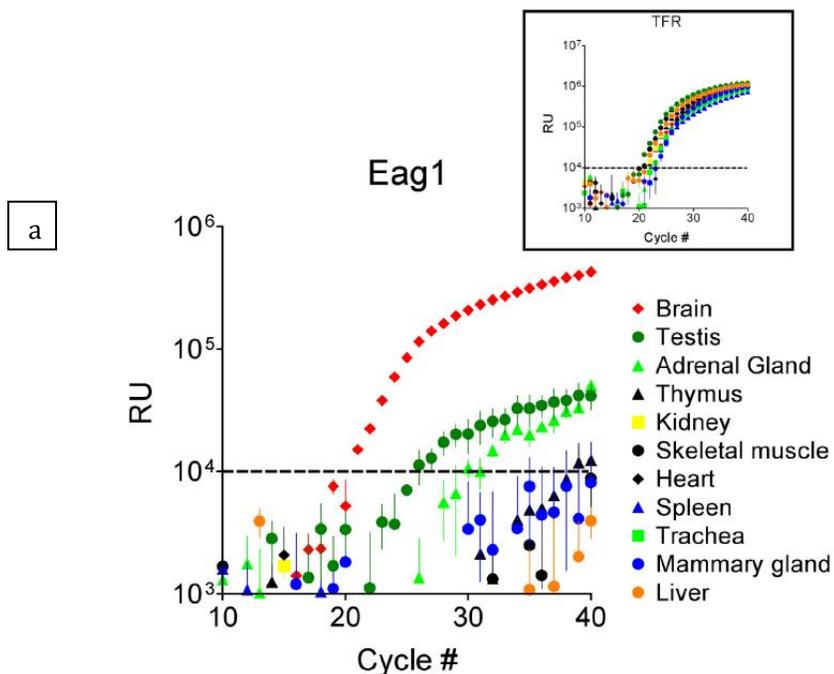


Figura 5. *Efecto Cole-More de los canales Eag1.* A prepulsos más negativos y a mayor concentración de magnesio, la activación de los canales se vuelve más lenta (Bauer y Schwarz, 2001).

1.7 Canales Eag1 y el Cáncer.

La expresión de Eag1 en tejido sano se encuentra limitada casi exclusivamente al cerebro aunque también se ha encontrado (en menor cantidad) expresado en testículo, glándula adrenal y transitoriamente en mioblastos (Pardo et. al., 1999, Occhiodoro et. al., 1998, Hemmerlein et. al., 2006); de manera muy importante se ha encontrado una fuerte expresión en la placenta y en las células del endotelio vascular (Díaz et. al., 2009) (Figura 6).



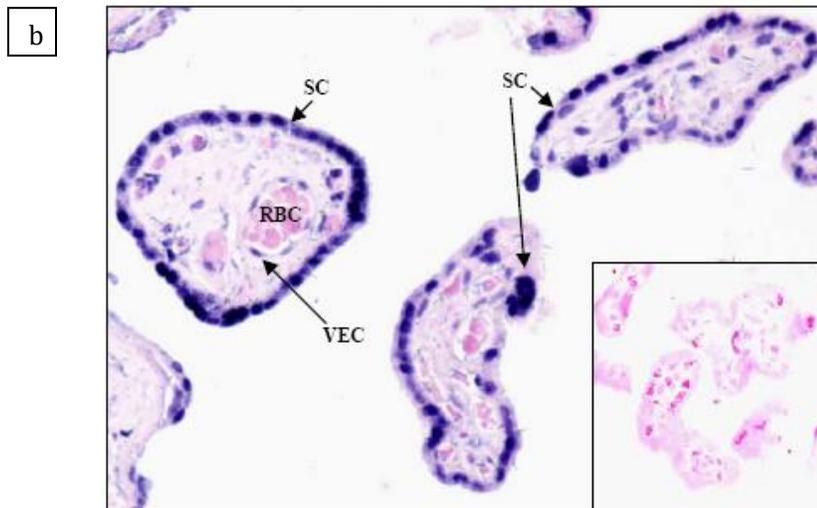


Figura 6. *Expresión de Eag1 en tejido sano.* En a) se observa el nivel de expresión de Eag1 por PCR en tiempo real en diferentes tejidos (En el inserto se observa el nivel de expresión del gen endógeno). b) Inmunolocalización de Eag1 en membrana de sincitiotrofoblasto y en el núcleo de células del endotelio vascular (Hemmerlein et. al., 2006, Díaz et.al., 2009).

Si bien la expresión de Eag1 en tejido sano es limitada, la expresión del mismo es muy elevada en las líneas celulares cancerosas incluyendo cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer cervical, cáncer de ovario, queratinocitos transfectados con los oncogenes del virus del papiloma humana E6/E7, neuroblastoma, melanoma, cáncer gástrico y leucemia (Díaz et. al., 2009, Pardo et. al., 1999, García-Becerra et. al., 2010, Asher et. al., 2010, Meyer et. al., 1999, Gavrilova-Ruch et. al., 2002, Agarwal et. al., 2010). De igual manera, se ha encontrado una alta expresión en diferentes biopsias de los pacientes con diversos tipos de cáncer como hígado, cervix, pulmón, mama, colon y próstata entre otros (Hemmerlein et. al., 2006, Farías et. al., 2004, Ousingsawat et. al., 2007).

Eag1 participa en la proliferación celular y la progresión tumoral. Se ha encontrado que las células CHO (ovario de hámster chino) que son transfectadas con el canal, proliferan más (aún en condiciones de bajas concentraciones de suero) y pierden su capacidad de inhibición por contacto comparadas con las células silvestres. Eag1 favorece la progresión de tumores ya que cuando se implantan células transfectadas con el canal en ratones inmunodeprimidos, éstas forman tumores más grandes y más agresivos que las células transfectadas con otro canal de potasio (Pardo et. al., 1999) (Figura 7A y B).

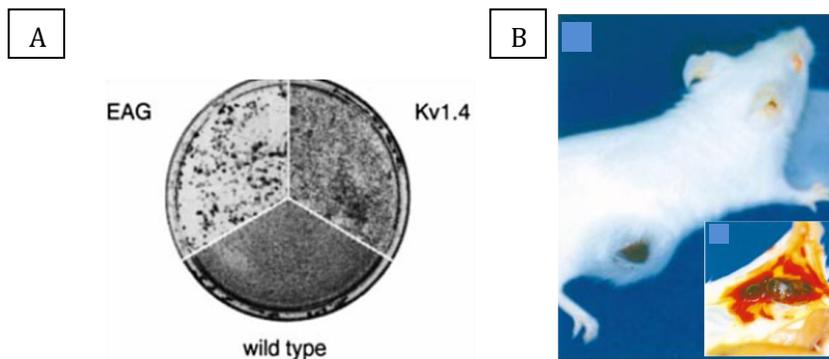


Figura 7. *Actividad transformante de Eag1.* A) Células transfectadas con Eag1 pierden su capacidad de inhibición por contacto y forman tumores agresivos y necróticos en ratones inmunodeprimidos B) (Pardo et. al., 1999).

Aunado a esto, estudios recientes han demostrado que Eag1 podría funcionar no solo como marcador de cáncer sino también como marcador tumoral temprano.

1.8 Eag1 como Marcador Tumoral Temprano.

Eag1 podría funcionar como marcador tumoral temprano, ya que se ha encontrado la expresión del mismo en biopsias de cérvix normales por papanicolau que presentan diversos tipos de alteraciones como son la infección por virus del papiloma humano de alto riesgo (HR-HPV), la hiperplasia adenomatosa atípica de endometrio y el tumor benigno en ovario, lesiones que si bien no son cáncer, son factores que podrían llevar al desarrollo del mismo (Figura 8a) (Farías et. al., 2004). De igual manera, se ha encontrado la expresión de Eag1 en muestras de diverticulitis, un grado de lesión temprana que en algunos casos puede llevar al desarrollo de cáncer de colon (Ousingsawat et. al., 2007). Además, se ha encontrado la expresión del mensajero de Eag1 en muestras de tejido que aparentan ser normales cuando se analizan histológicamente pero que se encuentran circundantes al desarrollo de tumores de glándula mamaria (Figura 8b) (Hemmerlein et. al., 2006). Otro trabajo importante que permite postular la posibilidad de marcador temprano del cáncer es la determinación de la expresión de Eag1 mediante inmunocitoquímica en muestras de displasias cervicales con lesiones intraepiteliales de bajo o alto grado las cuales muestran la expresión a nivel de membrana celular y nuclear. Se ha reportado que las

células que morfológicamente no se muestran transformadas, pero que provienen de displasias cervicales, expresan también el canal Eag1 (Figura 8c) (Ortiz et. al., 2011).

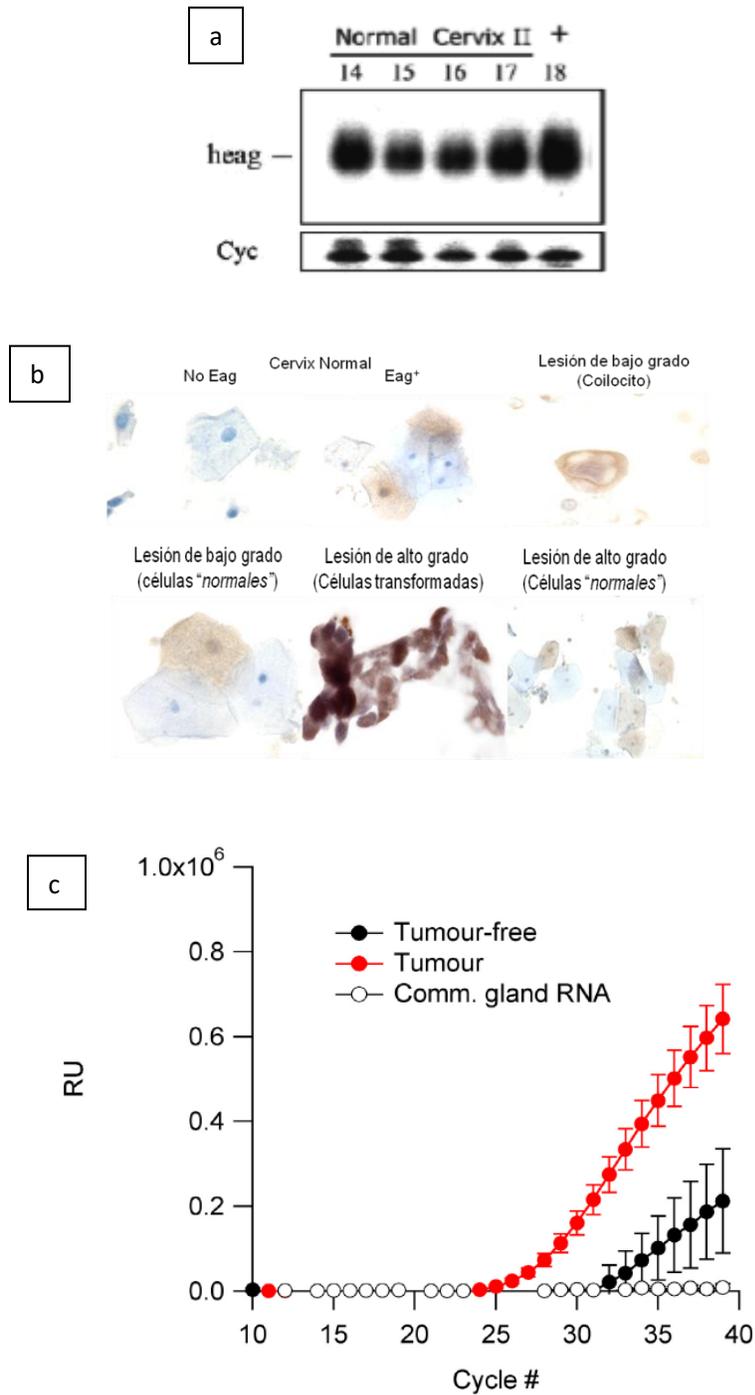


Figura 8. *Eag1* como marcador tumoral temprano de lesiones cervicales. a) Expresión de *Eag1* por Southern blot en biopsias cervicales negativas a papanicolau. b) Citologías de displasia cervical, expresión de *Eag1* (en café) en células normales y transformadas. c) Mensajero de *Eag1* en tejido circundante al tumor de mama estudiado por PCR en tiempo real (Farías et. al., 2004, Hemmerlein et. al., 2006, Ortiz et. al., 2011).

Los datos anteriores sugieren a *Eag1* como un marcador tumoral potencial, por lo que podría servir como una herramienta de suma utilidad para el diagnóstico oportuno de algunos otros tipos de cáncer.

Además de lo anterior, de manera muy interesante se ha encontrado que *Eag1* puede funcionar como blanco terapéutico para el tratamiento del cáncer, como se describe a continuación.

1.9 *Eag1* como Blanco Terapéutico en Cáncer.

Eag1 ha tomado mucha importancia como blanco terapéutico potencial debido a que se ha encontrado que su inhibición tanto a nivel de expresión de genica con oligonucleótidos antisentido y RNA de interferencia o bien del bloqueo de su actividad con anticuerpos monoclonales o fármacos bloqueadores inespecíficos del

canal (astemizol e imipramina), reduce la proliferación celular tumoral *in vitro* e *in vivo* (Figura 9) (Oquadid-Ahidouch et. al., 2011, Díaz et. al., 2009, Pardo y Stuhmer, 2008, Weber et. al., 2006, Pardo et. al., 1999, García-Becerra et. al., 2010, Gavrilova-Ruch et. al., 2002, Gómez-Varela et. al., 2007, García-Ferreiro et. al., 2004). El astemizol un antihistamínico de segunda generación, inhibe al canal Eag1 y disminuye la proliferación de las células tumorales que lo expresan, dicho efecto antiproliferativo podría ser consecuencia del bloqueo de Eag1 por el astemizol (Oquadid-Ahidouch et. al., 2001, Díaz et. al., 2009, Downie et. al., 2008). También se ha observado efectos *in vivo* del astemizol sobre el crecimiento tumoral; la administración diaria del astemizol reduce el crecimiento de los tumores implantados en ratones (Downie et. al., 2008). Los datos anteriores reflejan la importancia del canal Eag1 como potencial blanco para la terapia anticáncer y del uso del astemizol como fármaco anti-tumoral (García-Quiroz y Camacho, 2011, Pardo y Stuhmer, 2008, Wulff et. al., 2009).

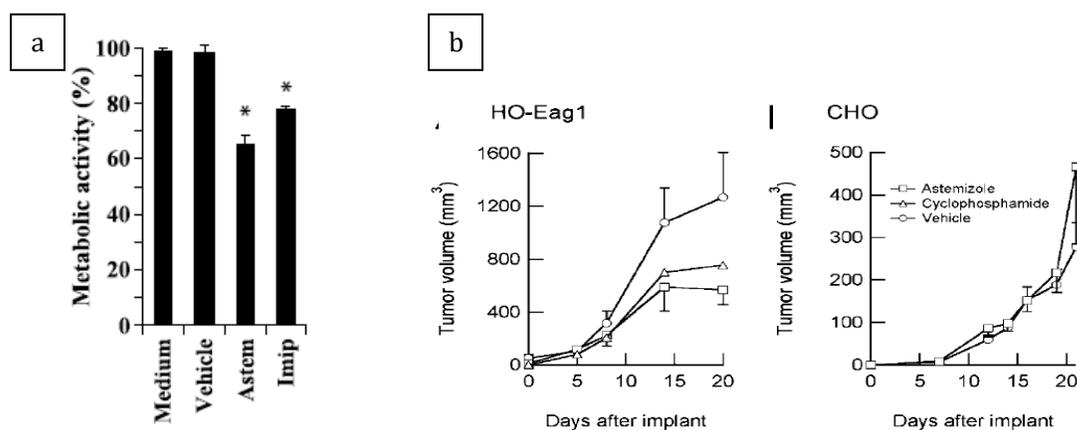


Figura 9. Efecto del bloqueo de Eag1 sobre la viabilidad celular y el volumen tumoral. a) Inhibición de la viabilidad celular en queratinocitos transformados tratados con

astemizol. b) Disminución del volumen tumoral en ratones bajo tratamiento con astemizol (Díaz et. al., 2009, Downie et. al., 2008).

1.10 Astemizol.

El astemizol es un antihistamínico de segunda generación que no atraviesa la barrera hematoencefalica, y compite con la histamina por los sitios de unión a los receptores H1 (Figura 10).

Existen cuatro tipos de receptores a histamina (H1-H4) (Parsons y Ganellin, 2006). De manera muy interesante se ha observado que la activación de los receptores H1 y H2 conducen a la proliferación celular en tejidos normales o malignos dependiendo del tipo celular y de la concentración de la histamina (García-Quiroz y Camacho, 2011), además, algunos tipos de antihistamínicos inhiben el efecto proliferativo de la histamina en las células malignas (Reynolds et. al., 1996). Interesantemente, el astemizol se ha sugerido como un agente terapéutico para tratar diferentes tipos de cáncer; sin embargo, sus efectos anticáncer han sido atribuidos no sólo al bloqueo de los receptores H1 (García-Quiroz y Camacho, 2011) si no que también se han encontrado diferentes blancos del astemizol: los receptores H1, la glicoproteína-p, y los canales de potasio Eag (blancos que se han visto involucrados en cáncer) (Parsons y Ganellin, 2006, García-Quiroz y Camacho, 2011, Ouadid-Ahidouch

et. al., 2001, Díaz et. al., 2009, Downie et. al., 2008, Pardo y Stuhmer, 2008, Weber et. al., 2006, Wulff et. al., 2009, Ishikawa et. al., 2000). Se ha demostrado que el astemizol potencia el efecto inhibitorio de la doxorubicina en las células de leucemia resistentes a doxorubicina por inhibir la glicoproteína-p, una proteína de resistencia a multidroga codificada en el gen *ABCB1* (Ishikawa et. al., 2000). Más recientemente, el efecto inhibitorio del astemizol sobre las células cancerosas ha sido atribuido al efecto del bloqueo de los canales de potasio, principalmente el canal Eag1 (García-Quiroz y Camacho, 2011, García-Ferreiro et. al., 2004, Downie et. al., 2008, Wulff et. al., 2009). Por lo anterior, el reposicionamiento de algunos viejos fármacos con nuevos efectos anticáncer es una buena alternativa para la lucha contra el cáncer. Un ejemplo de esto es el nuevo uso de la talidomida para el tratamiento contra el mieloma múltiple (Suzuki, 2013).

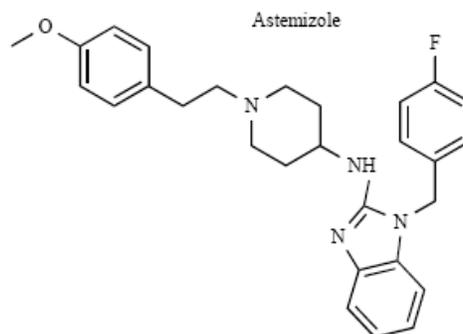


Figura 10. Estructura química del antihistamínico astemizol (García-Quiroz y Camacho, 2011).

Por todo lo antes mencionado resulta urgente encontrar nuevos blancos terapéuticos y marcadores tumorales para el diagnóstico oportuno y el tratamiento efectivo tanto del cáncer cervical como del cáncer hepático. El canal de potasio Eag1 ha demostrado ser un prometedor blanco terapéutico y marcador tumoral para diversos tipos de cáncer, por lo que el bloqueo de éste podría funcionar en el tratamiento del cáncer cervical y hepático, además podría funcionar como un marcador tumoral para el cáncer hepático. El astemizol cuando es utilizado en células que expresan el canal Eag1 ha mostrado efectos sobre la disminución de la proliferación celular y el volumen tumoral, por lo que el uso de éste para el tratamiento del cáncer augura resultados prometedores.

2. JUSTIFICACIÓN.

Los tratamientos para el cáncer en la práctica médica actual no son efectivos en el cáncer avanzado, además cuando se usan en el cáncer detectado en etapas tempranas no presentan garantía de cura y producen efectos adversos a los pacientes.

Por lo anterior es de suma importancia encontrar nuevos marcadores tempranos pero sobre todo, tratamientos efectivos para las diversas etapas de la enfermedad.

3. HIPÓTESIS.

El tratamiento con astemizol disminuirá la proliferación y aumentará la apoptosis en las células de cáncer cervical y hepático. Además, disminuirá el tamaño de los tumores o la aparición de los mismos en un modelo *in vivo* de cáncer hepático. Habrá una expresión diferencial de *Eag1* en las diferentes etapas de desarrollo del cáncer hepático.

4. OBJETIVOS.

4.1 OBJETIVO GENERAL.

Investigar el efecto del astemizol sobre la proliferación y la apoptosis de las líneas celulares de cáncer cervical y hepático, así como sobre el desarrollo tumoral en un modelo de cáncer hepático, y también investigar si tales efectos se asocian a cambios en la expresión de *Eag1*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Investigar el efecto del astemizol y la imipramina (bloqueador inespecífico de Eag1, el cual ha mostrado menor efecto que el astemizol) sobre la proliferación y la apoptosis de las líneas celulares de cáncer cervical y de cáncer hepático.
- Desarrollar el modelo de cáncer hepático en ratas Wistar y estudiar el efecto del astemizol sobre el desarrollo tumoral.
- Realizar estudios histopatológicos, así como estudios de la expresión génica y de proteína para Eag1 por medio de RT-PCR en tiempo real e inmunohistoquímica, respectivamente.
- Investigar el desarrollo tumoral por medio de la medición de la actividad de la enzima GGT, la cual es un marcador de daño hepático comúnmente utilizado.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 Líneas Celulares y Reactivos.

Las líneas celulares de cáncer cervical HeLa, SiHa, CaSki, INBL, y C-33A, así como la línea celular de cáncer hepático HepG2, todas provenientes de seres humanos, se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA), y cultivadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El astemizol fue amablemente donado por los laboratorios Liomont (México) y la imipramina, así como el DMSO se compraron a la empresa Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, USA). El anticuerpo monoclonal anti-Eag1 de obtuvo de Novus International (Littleton CO, USA).

5.2 Inmunocitoquímica.

Las líneas celulares se crecieron sobre laminillas cargadas y se sometieron al calor para la recuperación antigénica, posteriormente se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena por 10 minutos (Bio SB, Santa Barbara, CA, USA), después las laminillas se incubaron en presencia del anticuerpo para Eag1 (1:500) por toda la noche (Novus International). Al día siguiente, las laminillas se incubaron con el

anticuerpo secundario comercial de Bio SB por 15 minutos y posteriormente, se incubaron con estreptavidina por 15 minutos más (Bio SB). La reacción se terminó incubando las laminillas en presencia de diaminobencidina. La presencia de la proteína se observa como una tinción café (BioSB). Las laminillas se contra-tiñeron con hematoxilina (Dako, Glostrup, Denmark) y observadas en el microscopio Olympus IX51; las imágenes se tomaron con una cámara DP70 Olympus.

5.3 Actividad metabólica (ensayo MTT).

La proliferación celular se estudió por medio del método MTT de medición de la actividad metabólica. Las células se sembraron en placas de 96 pozos y la proliferación celular se ensayó por el método colorimétrico basado en la conversión de las sales de tetrazolium a cristales de formazán, por la actividad de la enzima deshidrogenasa en la mitocondria [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT). Para la cual se uso el “cell proliferation kit I”, obtenido de Boehringer Mannheim GmbH. Las células se incubaron durante 96 horas en el medio de cultivo solo o en presencia del astemizol (2 $\mu\text{mol/L}$ and 5 $\mu\text{mol/L}$), imipramina (10 $\mu\text{mol/L}$), o vehículo (DMSO). El MTT (0.5 mg/mL) fue adicionado 4 horas antes del término del tratamiento. Una vez finalizado el tiempo de tratamiento, se agregó SDS (al 10% en HCl) para disolver los cristales. Finalmente, los valores de absorbancia fueron obtenidos mediante un fotómetro de microplaca (Sunrise Touchscreen).

5.4 Apoptosis.

En las células normales la distribución de los fosfolípidos de la membrana es asimétrica, la membrana interna contiene fosfolípidos aniónicos como la fosfatidilserina (PS) y la externa fosfolípidos neutros. En la célula apoptótica se produce la translocación de restos de PS de la membrana interna a la externa, esto ocurre durante la apoptosis temprana donde se mantiene la integridad de la membrana. La anexina-V es una proteína con gran afinidad a los restos de PS, por lo tanto la anexina se puede unir a las células apoptóticas por exponer los restos de PS al exterior, discriminando así las células apoptóticas de las normales. Dado que la membrana de las células necróticas se permeabiliza estas pueden unir también anexina por lo que para distinguir las de las células apoptóticas se usa el yoduro de propidio (IP) el cual se une al DNA por lo tanto solo las células necróticas podrán capturar el IP.

Viables: No unen anexina ni IP

Apoptosis temprana: Unen anexina-V

Apoptosis tardía: Unen anexina e IP

Necrosis: Unen IP mayormente

Las células se sembraron en cajas de cultivo de 60 mm y se incubaron durante 96 horas con el medio de cultivo solo o en presencia del astemizol (2 $\mu\text{mol/L}$ y 5 $\mu\text{mol/L}$), imipramina (10 $\mu\text{mol/L}$), o vehículo (DMSO). Camptotecina (inductor de apoptosis) y metanol (inductor de la necrosis) se usaron como controles positivos, los cuales fueron adicionados 24 horas antes del término del tratamiento. La apoptosis se determinó mediante la unión de la anexina V-FITC a la fosfatidilserina y a la tinción del DNA con yoduro de propidio (PI) [Annexin V-FITC kit (Invitrogen Co.)]. Los experimentos se llevaron a cabo por medio de citometría de flujo [cytometer CYAN ADP (Dako, Glostrup, Denmark)]. El porcentaje de células viables (FITC y PI negativas), de células apoptóticas (FITC positivas y PI negativas), y de células en apoptosis tardía (FITC y PI positivas) se obtuvieron por medio del análisis de cuadrantes usando el Software Summit 4.3.

5.5 Animales y tratamiento.

En el presente trabajo se utilizó el modelo de la hepatocarcinogénesis en la rata mediante N-dietilnitrosamina (DEN) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), el cual recapitula la formación secuencial de cirrosis-HCC como suele suceder en los humanos (Schiffer et. al., 2005). El protocolo de experimentación se aprobó por el Comité correspondiente del Cinvestav (CICUAL). Las ratas se alimentaron con la dieta Purina Chow y agua *ad libitum*. La Figura 11 muestra un esquema de los diferentes

grupos y los tratamientos. Las ratas Wistar macho de 200g de peso (UPEAL-Cinvestav, México) recibieron inyecciones intraperitoneales de DEN (50 mg/kg) una vez a la semana por 12 o 16 semanas siguiendo el procedimiento descrito por Schiffer et. al., 2005. El astemizol se administró oralmente a una dosis de 50 mg/kg diariamente durante 4, 12, o 18 semanas dependiendo del grupo. El grupo control fue tratado con PBS por 18 semanas. Los animales se pesaron semanalmente y al término del tratamiento se sacrificaron por decapitación. Los hígados se disectaron rápidamente, se pesaron y fotografiaron; posteriormente se cortaron y una sección fue congelada y almacenada a -80°C, otra sección fue homogeneizada con TRIzol para la posterior obtención de RNA y una última sección se fijó en formaldehído al 4% para posteriores estudios de inmunohistoquímica.

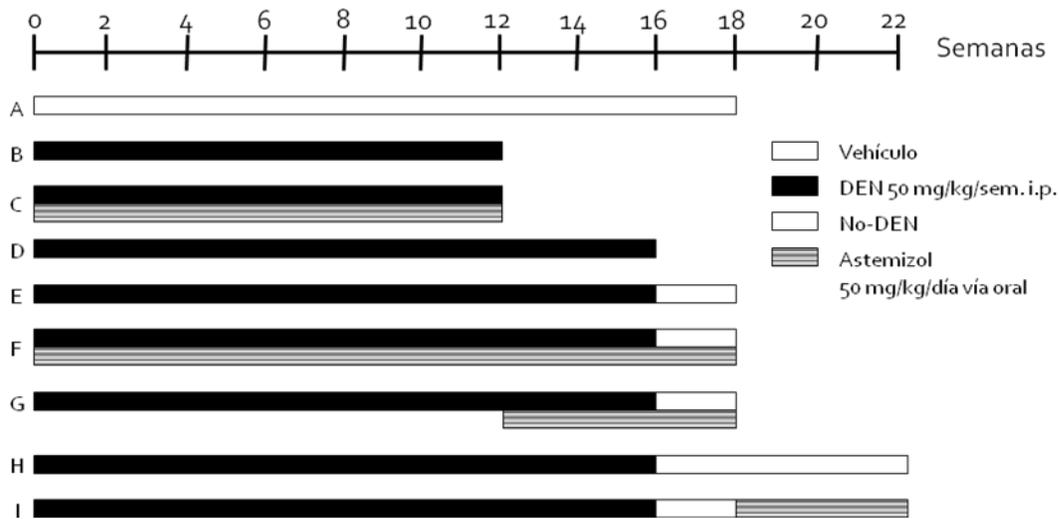


Figura 11. Régimen de dosificación y grupos estudiados en el modelo de CHC. El grupo A recibió únicamente vehículo (PBS). El DEN se administró durante 12 (Grupos B y C) o 16

semanas (Grupos D-I). El astemizol se administró desde el inicio (Grupos C y F), desde las 12 semanas (Grupo G), o después del tratamiento con DEN (Grupo I).

5.6 Histología e inmunohistoquímica.

Histoquímica GGT: Cortes representativos de 15 μm de grosor de los hígados congelados se tiñeron para detectar la actividad de la enzima GGT de la siguiente manera: los cortes se montaron en las laminillas y estas se fijaron por 10 minutos con etanol al 96% y posteriormente, incubadas 30 minutos con solución de GMNA (125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de γ -glutamil-4-metoxi-2-naftilamina (GMNA), 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ glicilglicina, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de sal Fast blue BB en Tris 100 mM, pH 7.4). Posteriormente, las laminillas se incubaron por 5 minutos con una solución de CuSO_4 0.1M, finalmente las laminillas se dejaron secar y se escanearon en alta resolución. El análisis del porcentaje de las áreas GGT positivas (precipitado rojo) se llevó a cabo mediante el Software ImageJ 1.45g (NIH, USA).

Inmunohistoquímicas: los hígados fijados en formaldehído se embebieron en parafina y se realizaron cortes de 4 μm de grosor, los cuales se montaron en laminillas cargadas (con silano); posteriormente los tejidos se desparafinaron mediante xileno y series decrecientes de etanol. Las laminillas se sumergieron en buffer de EDTA (0.01 mol/L (pH 8.0) y se realizó la recuperación antigénica mediante calor. Posteriormente, se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena por 10 minutos (Bio SB, Santa Barbara, CA, USA); después, las laminillas se incubaron en presencia del

anticuerpo para Eag1 (1:500) por toda la noche (Novus International). Al día siguiente, las laminillas se incubaron con el anticuerpo secundario por 15 minutos (Bio SB) y posteriormente, se incubaron con estreptavidina por 15 minutos más (Bio SB). La reacción se completó incubando las laminillas en presencia de diaminobencidina (BioSB). La presencia de la proteína se observa como una tinción café. Las laminillas se contra-tiñeron con hematoxilina (Dako, Glostrup, Denmark) y se observaron en el microscopio Olympus IX51; las imágenes se capturaron con una cámara DP70 Olympus.

5.7 PCR en tiempo real.

El RNA total se extrajo de los hígados mediante el homogeneizado con TRIzol. Se tomaron cinco μg del RNA total para la reacción de la reverso-transcripción usando la Moloney Murine Leukemia Virus Reverso-Transcriptasa (M-MuLV) (BioLabs Inc.). Los experimentos de PCR en tiempo real se llevaron a cabo con 2 μl de cDNA usando el sistema de detección TaqMan™ (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) y el kit de reactivos Universal PCR Master Mix (Life Technologies). Las secuencias de primers empleadas fueron las siguientes: GATCTTCGCCGTAGCCATCAT (forward), TCCCAAAGATGGTGGCATAACAG (reverse), sonda: AAGGGAGCCAATCATC para *Eag1* de rata, y GTCCATTCCCTATGACTGTAGATTTTATCAGA (forward), AATAACTTTTATGTCCCCCGTTGACT (reverse), sonda: CTGAAGAGCTACTGTAATGAC para hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HPRT) de rata, la cual fue usada como

gen constitutivo. El protocolo de reacción empleado fue 95 °C por 10 minutos, 95 °C por 15 segundos y 60 °C por 1 minuto (40 ciclos). Los datos fueron analizados por medio del método de la $2^{-\Delta\Delta Ct}$ que permite la cuantificación relativa de la expresión genética. Esta técnica consiste en restar el valor de Ct del gen problema al Ct del gen endógeno, y de este modo se obtiene la primera delta ($1^a \Delta$). Una vez realizado este paso tanto para el control como para los tratamientos, se obtiene la segunda Δ al restar el valor de la 1^a delta de un tratamiento al valor de la $1^a \Delta$ del control. Cuando el gen problema es menos abundante que el gen endógeno la segunda delta deberá ser de un valor negativo por lo que se multiplica por -1, esto aún si el valor de la $2^a \Delta$ fuera positivo y es elevado como exponente de la base 2, resultando así el valor del incremento en el número de veces en la expresión del gen de interés, corregido por el gen endógeno en el mismo tratamiento y por la expresión génica del control. Para obtener el valor del control como 1, se resta a sí mismo la $1^a \Delta$, lo que da un valor de cero, y este elevado como exponente de base 2 origina el valor de 1.

5.8 Análisis Estadístico.

Los datos se analizaron por medio del programa GraphPad Prism 5.0 aplicando ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey-Kramer. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de $p < 0.05$.

6. RESULTADOS.

6.1 El Astemizol Disminuye la Viabilidad Celular en Células de Cáncer Cervical.

Anteriormente, en nuestro grupo de trabajo, ya se había demostrado la expresión del canal Eag1 en las líneas de cáncer cervical aquí estudiadas, así que se decidió estudiar el efecto de los dos bloqueadores no selectivos para el canal, astemizol e imipramina sobre la viabilidad de estas líneas. Mientras que la imipramina prácticamente no mostró efecto sobre la viabilidad, el astemizol fue capaz de reducirla en las 5 líneas celulares de cáncer cervical aquí estudiadas, especialmente a la concentración de 5 μ M (Figura 12).

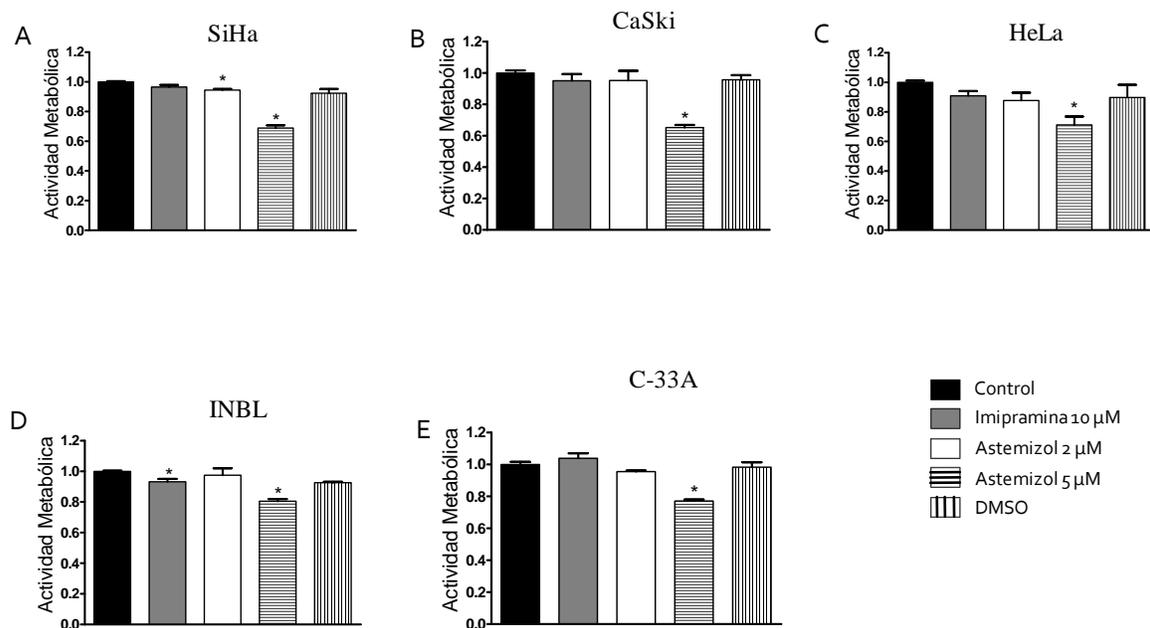


Figura 12. Efecto del astemizol sobre la viabilidad celular en las líneas de cáncer cervical. Ensayo de viabilidad celular mediante la técnica de MTT. Se probaron 3 cultivos diferentes con 6 réplicas técnicas cada uno. * $P < 0.05$ vs control.

6.2 El Astemizol Induce Apoptosis en Células de Cáncer Cervical.

Algo similar a lo anterior sucedió en el caso de la apoptosis. La imipramina no produjo ningun efecto sobre las líneas estudiadas, mientras que el astemizol (a la concentración de 5 µM) fue capaz de inducir apoptosis en un 20-70% del total de la población, dependiendo de la línea celular (Figura 13). Tomando los dos resultados anteriores podemos sugerir al astemizol como un agente terapéutico potencial para el cáncer cervical.

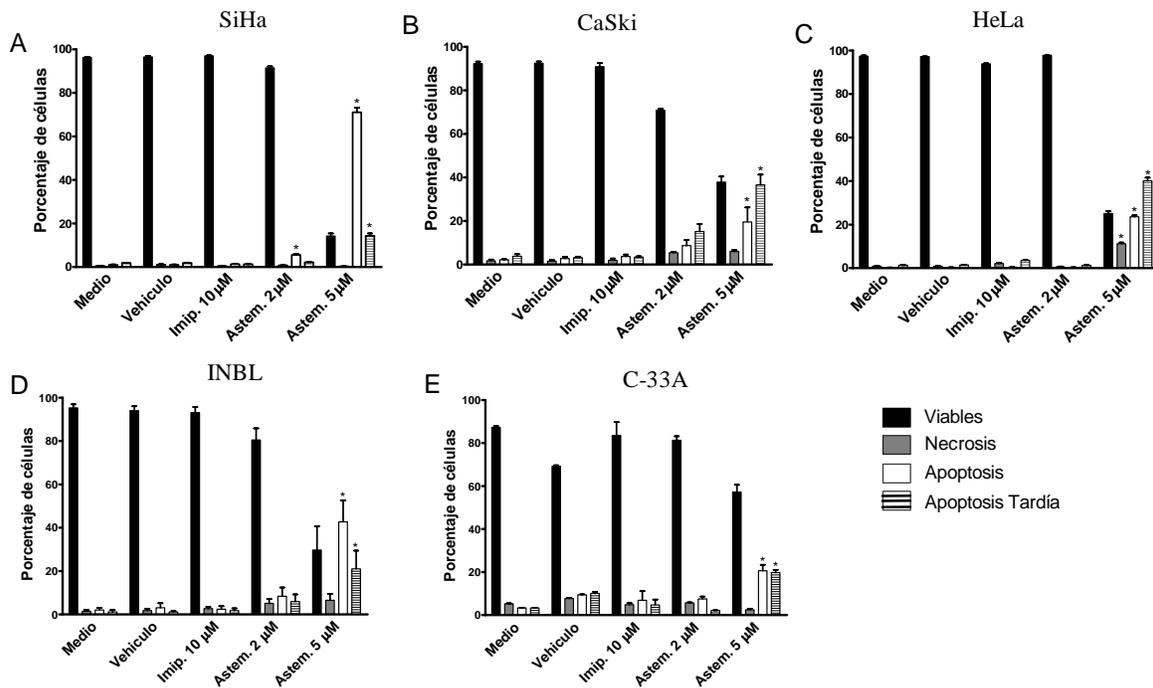


Figura 13. Efecto pro-apoptótico del astemizol en líneas celulares de cáncer cervical.

Las células se trataron por 96 hrs con los fármacos y ensayadas para apoptosis mediante el método de la anexina V. Se probaron tres cultivos independientes con 3 repeticiones técnicas cada uno. * $P < 0.05$ vs vehículo.

6.3 El Astemizol Disminuye la Viabilidad Celular e Induce Apoptosis en las Células de Cáncer Hepático que Expresan Eag1.

Primeramente se investigó la expresión de Eag1 en la línea celular de cáncer hepático HepG2 de seres humanos. Estudios anteriores de nuestro grupo de trabajo

demonstraron la expresión génica del mRNA de Eag1 en la línea celular HepG2; es por esto que se decidió buscar la expresión del canal a nivel de proteína. Los experimentos de inmunocitoquímica demostraron la expresión del canal en núcleo / citoplasma en todas las células (marca café) (Figura 14A). Posteriormente determinamos si los bloqueadores inespecíficos de Eag1, imipramina y el astemizol afectan la viabilidad celular y apoptosis de esta línea celular. Observamos que el astemizol fue capaz de disminuir la viabilidad celular alrededor del 50% (Figura 14B), mientras que la imipramina mostró sólo una leve tendencia a inhibirla. Además, tanto el astemizol como la imipramina fueron capaces de inducir apoptosis en la línea HepG2 (Figura 14C). El efecto citotóxico del astemizol *in vitro* nos impulsó a estudiar sus efectos en un modelo de carcinogénesis *in vivo*.

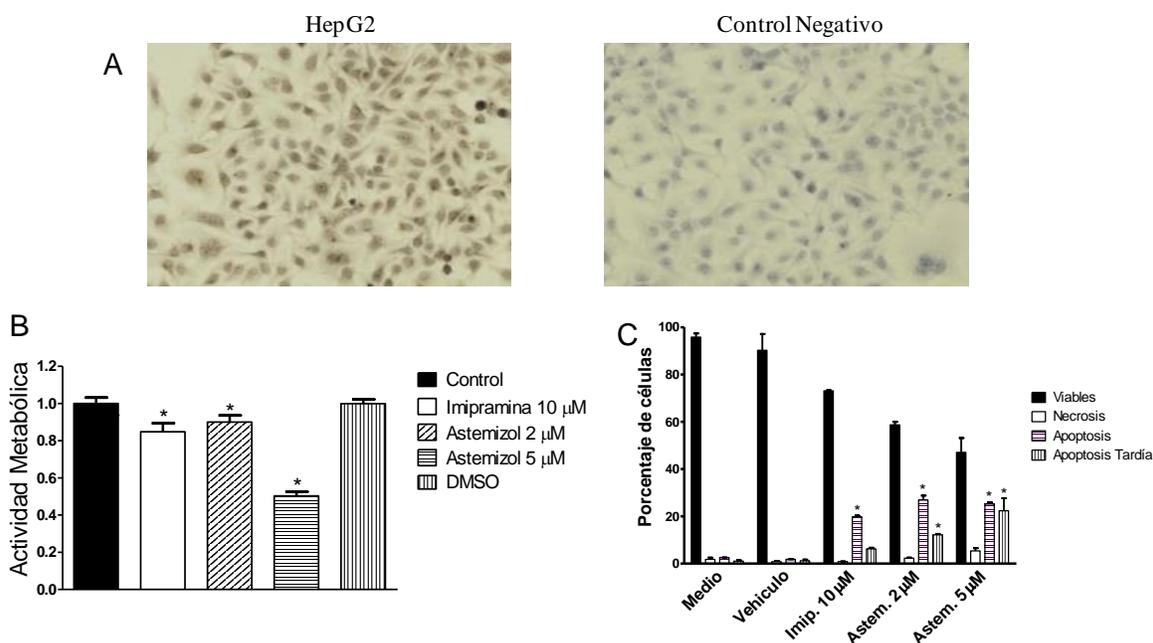


Figura 14. El astemizol disminuye la proliferación e induce apoptosis en células de CHC.

A) Inmunocitoquímica de Eag1 en células HepG2, la inmunodetección fue revelada por

la actividad peroxidasa usando DAB como sustrato (izquierda, marca café); no se observó marca en HepG2 cuando se realizó la técnica en ausencia del anticuerpo primario (Control Negativo derecha). B) Viabilidad celular en las células HepG2 bajo tratamiento con astemizol e imipramina por 96 hrs (% actividad metabólica). Se probaron 3 cultivos diferentes con 6 réplicas técnicas cada uno. $*P < 0.05$ vs control. C) Ensayo de apoptosis en las células HepG2, las células se trataron por 96 hrs con los fármacos. Se probaron tres cultivos independientes con 3 repeticiones técnicas cada uno. $*P < 0.05$ vs control.

6.4 Efecto Preventivo y Terapéutico del Astemizol en un Modelo *in vivo* de CHC.

Se estudió el efecto preventivo y terapéutico del astemizol en un modelo de cáncer hepatocelular (CHC) en rata. El desarrollo tumoral se monitoreó mediante histopatología en secciones teñidas con H&E y por la determinación histológica de nódulos de hepatocitos con actividad de la enzima GGT, la cual es comúnmente usada como marcador de hepatocarcinogénesis (Cameron et. al., 1978). Los cambios histopatológicos observados en cada grupo se resumen en la Tabla I. De manera macroscópica se observó lo siguiente: El grupo tratado únicamente con vehículo no mostró nódulos en el hígado de las ratas (Figura 15A), mientras que el tratamiento con el carcinógeno (DEN) claramente indujo la aparición de cirrosis micronodular y

nódulos hepáticos consistentes con cambios displásicos y hepatocarcinomas (Figuras 15B, D, E, H y Tabla I). El efecto preventivo del astemizol fue estudiado mediante la administración del mismo a las ratas tratadas con DEN desde el inicio del tratamiento o desde la semana 12 de tratamiento con DEN. El astemizol mejoró la apariencia del hígado y redujo la presencia de nódulos que se observan a simple vista. A nivel microscópico se observó fibrosis incipiente en la semana 12 y cambios histológicos benignos. (Figuras 15C, F, G y Tabla I). El efecto preventivo del astemizol más claro se observó cuando el grupo tratado con DEN por 16 semanas más 2 semanas sin DEN fue tratado con astemizol desde el inicio. La Figura 15E muestra un hígado representativo, con coloración amarilla (posible colestasis hepática), en el que se observan numerosos nódulos displásicos y regiones necróticas, notablemente el astemizol administrado desde el inicio fue capaz de preservar casi por completo la apariencia normal del hígado con menor una presencia de nódulos (Figura 15F). El astemizol también mostró un importante efecto protector cuando fue administrado a partir de las 12 semanas (Figura 15G).

Para estudiar el potencial efecto antineoplásico del astemizol, un grupo de ratas fue tratado con DEN por 16 semanas y se dividió en dos subgrupos, uno donde se dejó 6 semanas más sin carcinógeno (Figura 15H) y el otro donde el astemizol fue administrado durante 4 semanas después del tratamiento con el carcinógeno (DEN 16 semanas más 6 semanas sin DEN), de esta manera ambos grupos fueron estudiados durante 22 semanas. Las ratas que no recibieron tratamiento con astemizol desarrollaron tumores muy grandes (3-6 mm), el tratamiento con astemizol claramente evitó la aparición de tumores grandes (Figura 15H y 15I respectivamente).

Las observaciones cualitativas macroscópicas y microscópicas fueron confirmadas con mediciones cuantitativas como la determinación del porcentaje de tejido nodular que es positivo a la actividad de la enzima GGT. Las lesiones nodulares GGT+ incrementaron durante el desarrollo del CHC en ratas tratadas con DEN, notablemente el tratamiento con astemizol disminuyó significativamente la cantidad de nódulos con actividad de GGT, especialmente en el grupo DEN 16 semanas más 2 semanas sin DEN más astemizol desde el inicio (Figura 15J). Es importante mencionar que en el grupo que recibió astemizol por 4 semanas al final del tratamiento con carcinógeno (Figuras 15I y J), la actividad de GGT fue incluso menor que en el grupo tratado con DEN 16 semanas más 2 semanas sin DEN pero sin tratamiento con astemizol (Figuras 15E y J). Por lo anterior sugerimos que el astemizol podría ser empleado para evitar el crecimiento de los tumores hepáticos ya establecidos.

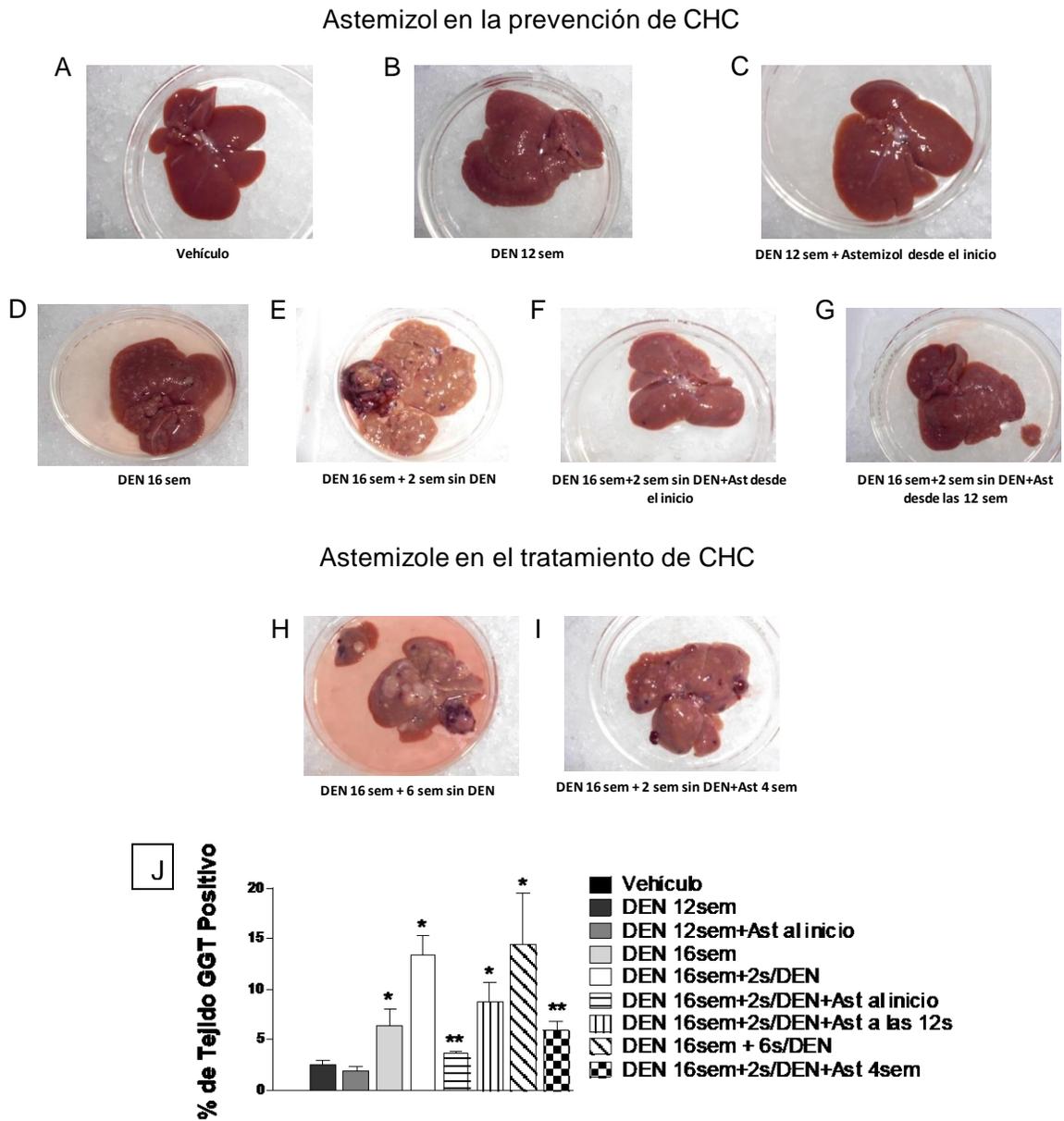


Figura 15. Efecto preventivo y antitumoral del astemizol en CHC. Se muestran hígados representativos de cada grupo (A-I). J) Porcentaje de tejido GGT positivo en los hígados de las ratas tratadas con DEN y astemizol. Ast=Astemizol, sem=semanas. * $P < 0.05$ vs vehículo (A), ** $P < 0.05$ vs DEN 16 semanas + 2 semanas sin DEN (E). $n = 4-8$ ratas por grupo.

Tabla I. Hallazgos histológicos hepáticos en el modelo de CHC.

Grupos	Dx. Histopatológico
Vehículo	Hepatocitos normales, compatible con hígado normal.
DEN 12 semanas	Cambios displásicos leve-moderado y cirrosis micronodular.
DEN12 sem + Astemizol al inicio	Arquitectura hepática preservada compatible con hígado normal y solo dos casos mostraron fibrosis incipiente.
DEN 16 semanas	Cambios displásicos moderado-alto grado y cirrosis micronodular.
DEN 16 sem + 2 sem sin DEN	Cambios consistentes con adenoma hepatocelular y cirrosis micronodular.
DEN 16 sem + 2 sem sin DEN + Astemizol a las 12 sem	Cambios histológicos benignos no específicos.
DEN 16 sem + 6 sem sin DEN	Cambios consistentes con hepatocarcinoma.
DEN 16 sem + 2 sem sin DEN + Astemizol 4 sem	Cambios histológicos benignos consistentes con cirrosis y un caso compatible con hepatocarcinoma.

6.5 Eag1 como Potencial Marcador Temprano de CHC.

Debido al efecto significativo del astemizol como quimiopreventivo del CHC, se pensó si la expresión de Eag1 podría ser modulada por el fármaco y si se expresa en las etapas tempranas del desarrollo del CHC y así servir como marcador temprano para esta enfermedad. El nivel de expresión de Eag1 se incrementó durante el desarrollo del CHC en la mayoría de los grupos tratados con DEN (Figura 16A), éste alcanzó su nivel máximo en el grupo tratado con DEN por 16 semanas más 2 semanas sin DEN. Interesantemente, el nivel de expresión de Eag1 fue más bajo en el grupo

correspondiente tratado con astemizol desde la semana 12 (DEN 16 semanas + 2 semanas sin DEN + astemizol desde la semana 12) (Figura 16A). La presencia de Eag1 a nivel de proteína fue estudiada en el tejido hepático de los grupos experimentales por inmunohistoquímica (Fig 16 B-H). Una débil expresión citoplasmática de Eag1 se observó en el grupo tratado con vehículo (Figura 16B), mientras que se encontró una fuerte expresión nucleo-citoplasma de Eag1 en los hígados con lesiones nodulares y cirrosis (Figuras 16C, E y Tabla II); por otra parte, la expresión de Eag1 fue baja en los grupos tratados con astemizol (Figura 16D, F y Tabla II). También de interés fue la localización celular de Eag1 en el grupo tratado con vehículo la cual, se observó únicamente en la membrana plasmática y en el citoplasma, mientras que la expresión en los grupos tratados con DEN se encontró adicionalmente en el núcleo. Curiosamente, la expresión de Eag1 en los hígados que mostraron CHC (DEN 16 semanas + 6 semanas sin DEN) fue débil, además, ésta resultó ligeramente mayor en el grupo correspondiente tratado con astemizol (DEN 16 semanas + 2 semanas sin DEN + astemizol 4 semanas) (Figura 16G, H y Tabla II). Los resultados anteriores sugieren que el canal Eag1 podría funcionar como marcador temprano de lesiones nodulares hepáticas.

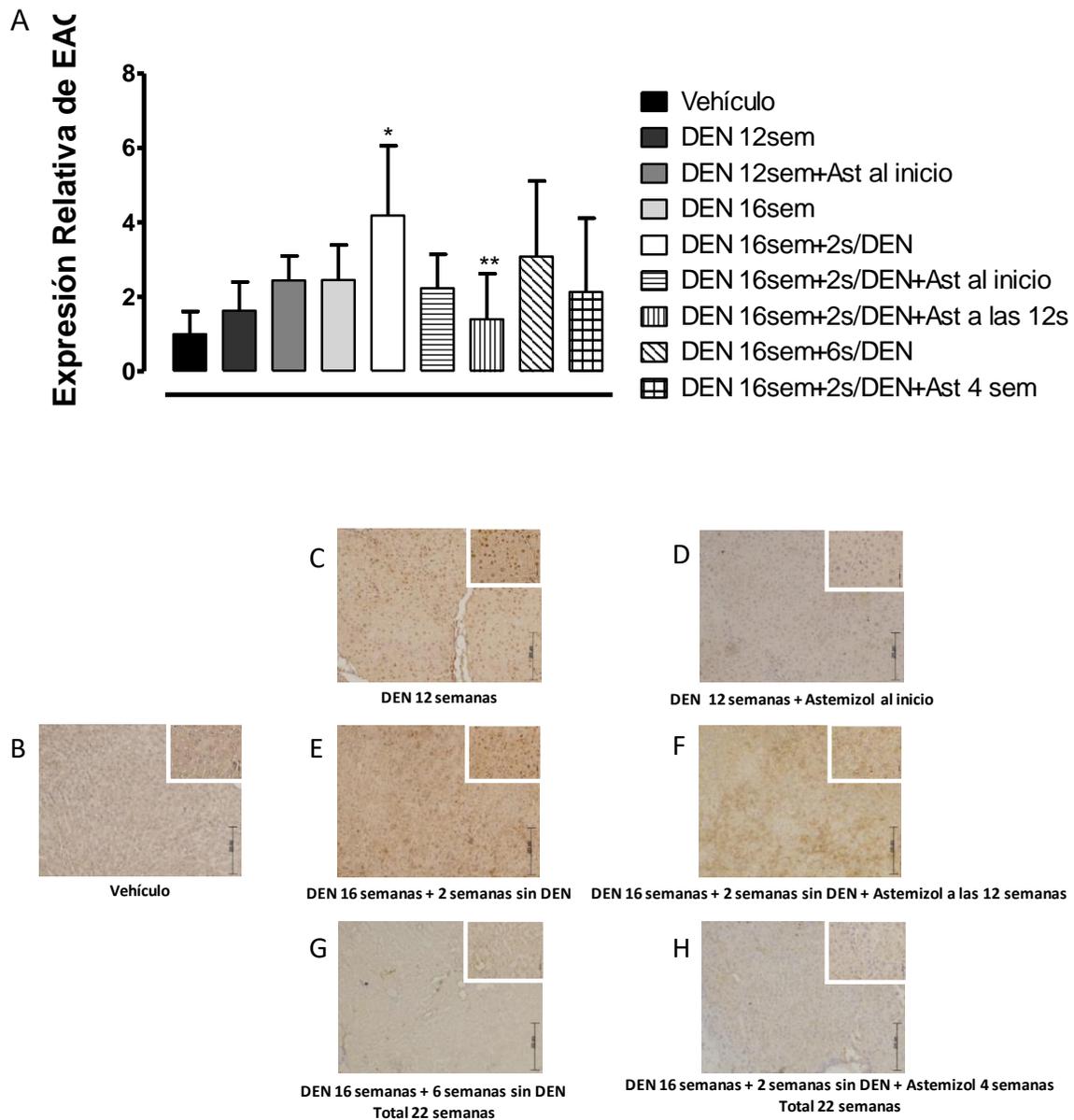


Figura 16. *Eag1* como marcador temprano para CHC. Se realizaron estudios de RT-PCR en tiempo real y de inmunohistoquímica para estudiar la expresión de *Eag1* a nivel de mensajero y proteína respectivamente. A) Expresión relativa de *Eag1* en los hígados de las ratas tratadas con DEN y astemizol. Inmunohistoquímica para *Eag1* (B-H), la inmunodetección fue revelada por la actividad peroxidasa usando DAB como

sustrato (marca café). * $P < 0.05$ vs vehículo, ** $P < 0.05$ vs DEN 16 semanas + 2 semanas sin DEN. $n = 4-8$ ratas por grupo.

Tabla II. Expresión de Eag1 a nivel de proteína en los hígados del modelo de CHC.

Grupos	# de ratas positivas/total de ratas	Localización de la Marca en los Hepatocitos	Intensidad	Intensidad	Intensidad
			+	++	+++
A	6/8	Membrana-citoplasma	6	-	-
B	5/5	Membrana-citoplasma-núcleo	-	-	5
C	6/7	Membrana-citoplasma-núcleo	4	2	-
E	5/7	Membrana-citoplasma-núcleo	-	-	5
G	6/6	Membrana-citoplasma-núcleo	-	6	-
H	0/4	Negativo	-	-	-
I	2/4	Membrana-citoplasma-núcleo	-	2	-

A = Vehículo; B = DEN 12 semanas; C = DEN 12 semanas+Astemizol desde el inicio; E = DEN 16 semanas+2 semanas sin DEN; G = DEN 16 semanas+2 semanas sin DEN+Astemizol a las 12 semanas; H = DEN 16 semanas+6 semanas sin DEN; I = DEN 16 semanas+2 semanas sin DEN+Astemizol 4 semanas.

7. DISCUSIÓN.

El cáncer cervical es una de las mayores causas de muerte por cáncer entre las mujeres en nuestro país, mientras que la mortalidad por cáncer de hígado está en los primeros 5 causas de muerte por tumores malignos en nuestro país. Además es la tercer causa de muerte por cáncer en el mundo (Franco et. al., 2001, WHO, El-Serag y

Rudolph, 2007, Globocan, 2008). La elevada mortalidad por estos cánceres justifica la investigación y la búsqueda de nuevos métodos diagnósticos pero sobre todo nuevos blancos terapéuticos para mejorar las terapias de estas enfermedades.

En el presente trabajo se mostró como el astemizol, un fármaco antihistaminico con capacidad de inhibir canales del tipo Eag1 fue capaz de disminuir la viabilidad celular e inducir la apoptosis en las células de cáncer cervical que expresan Eag1.

Los trabajos de nuestro grupo han propuesto la expresión de Eag1 como marcador de displasia y cáncer cervical (Farías et. al., 2004, Díaz et. al., 2009, Ortiz et. al., 2011); además se ha detectado la actividad del canal en cultivos primarios de cáncer cervical sugiriendo a Eag1 como un potencial blanco terapéutico (Farías et. al., 2004). Debido al papel de Eag1 en la proliferación celular, el canal ha ganado gran interés en oncología (Pardo y Stuhmer, 2008, Pardo et. al., 1999, Hemmerlein et. al., 2006, Rodríguez-Rasgado et. al., 2012). Por otra parte, el astemizol se ha sugerido como un nuevo fármaco anticáncer (Wulff et. al., 2009, Pardo y Stuhmer, 2008, García-Quiroz y Camacho, 2011), el cual ha probado sus efectos anti-proliferativos en células que expresan Eag1 como son las de mama y las de melanoma (Ouadid-Ahidouch et. al., 2001, Gavrilova-Ruch et. al., 2002). El conocimiento previo de la expresión del mensajero de Eag1, la proteína, así como la actividad en las células de cáncer cervical, motivó el estudio del efecto del astemizol sobre la viabilidad celular y la apoptosis el cual permanecía desconocido. En el presente trabajo se estudió el efecto del astemizol en 5 líneas celulares de cáncer cervical, donde se encontró una disminución en la viabilidad así como una inducción de la apoptosis. Interesantemente, la imipramina

(otro bloqueador inespecífico de Eag1) afectó la viabilidad celular pero en menor nivel que el astemizol, lo cual sugiere que el efecto del astemizol sobre las células de cáncer cervical podría ser mediado no solamente por el bloqueo de los canales Eag1. En este mismo sentido se ha encontrado que el astemizol tiene como blanco también a la glicoproteína-p (Ishikawa et. al., 2000), ésta confiere resistencia a varios tipos de cáncer (Breier et. al., 2013), además, se ha encontrado que también es capaz de bloquear al canal de potasio Erg que le confiere ventajas a las células cancerosas (Bianchi et. al., 1998). Debido a que el tratamiento antihistamínico afecta la proliferación celular (García-Quiroz y Camacho, 2011, Reynolds et. al., 1996), el efecto antiproliferativo del astemizol podría ser el resultado de la afectación de varias proteínas involucradas en el cáncer incluyendo el receptor a histamina H1, la glicoproteína-P y los canales de potasio Eag1 y Erg.

El cáncer cervical es una enfermedad multifactorial y el mayor factor de riesgo para el desarrollo de ésta, es la infección con el virus del papiloma humano (VPH) (Franco et. al., 2001). Las oncoproteínas de VPH E6 y E7, son capaces de inactivar a las proteínas supresoras de tumores p53 y Rb (zur-Hausen, 2002), interesantemente, se ha encontrado que la expresión de Eag1 es regulada por los oncogenes del VPH y por p53 (Díaz et. al., 2009, Lin et. al., 2011). Estudios de nuestro grupo de trabajo han demostrado que el astemizol disminuye la proliferación celular de queratinocitos transformados con los oncogenes E6 y E7 (Díaz et. al., 2009). En el presente estudio se observó los efectos antiproliferativos y proapoptóticos del astemizol sobre cinco líneas de cáncer cervical con diferentes estatus de VPH (CaSki y SiHa expresan el VPH16, mientras que HeLa e INBL expresan el VPH18, las células C-33A no expresan

el virus del VPH). Por todo lo anterior, el astemizol podría ser usado para el tratamiento contra el cáncer cervical independientemente del estatus de VPH, además, nuestros resultados sugieren que el astemizol podría servir como una alternativa terapéutica para el cáncer cervical.

Por otra parte, nuestros resultados sugieren que el antihistamínico astemizol podría ser utilizado con un nuevo enfoque terapéutico para el tratamiento y la prevención de CHC, además, los resultados en los tejidos del hígado de rata, sugieren a Eag1 como posibles marcadores tempranos del CHC. El reposicionamiento de viejos fármacos con nuevas propiedades antitumorales ofrece una alternativa viable y rentable para combatir el cáncer. Por ejemplo, la talidomida fue retirada del mercado debido a sus efectos teratogénicos, pero ha adquirido gran relevancia en los últimos años debido a su potencial efecto anticancerígeno en el mieloma múltiple (Suzuki, 2013). Del mismo modo, el astemizol fue retirado del mercado en algunos países debido a sus efectos adversos sobre la función cardíaca, pero ha ganado mucho interés como un nuevo fármaco contra el cáncer (Parsons y Ganellin, 2006, García-Quiroz y Camacho, 2011, Reynolds et. al., 1996, García-Ferreiro et. al., 2004, Ouadid-Ahidouch et. al., 2001, Díaz et. al., 2009, Downie et. al., 2008, Pardo y Stuhmer, 2008, Weber et. al., 2006, Wulff et al., 2009). El astemizol es muy atractivo como una molécula potencial anticáncer, ya que tiene como blanco varias proteínas implicadas en el cáncer como son, los receptores de histamina H1, glicoproteína-P y los canales de potasio Eag1 y Erg (Parsons y Ganellin, 2006, Gracia-Quiroz y Camacho, 2011, Ouadid-Ahidouch et. al., 2001, Díaz et. al., 2009, Downie et. al., 2008, Pardo y Stuhmer, 2008, Weber et. al., 2006, Wulff et. al., 2009, Ishikawa et. al., 2000).

En el presente trabajo, se muestra que el astemizol inhibe la viabilidad celular y aumenta la apoptosis de las células del carcinoma hepatocelular humano HepG2. A pesar de que el astemizol puede actuar a través de diferentes blancos, el bloqueo de la actividad transportadora del canal Eag1 por astemizol es un posible mecanismo del efecto anti-proliferativo y pro-apoptótico del astemizol en células de CHC ya que las células estudiadas expresan la proteína Eag1. Debido a que la expresión de Eag1 ha sido reportada en biopsias humanas de tumores hepáticos (Hemmerlein et. al., 2006), el astemizol puede también ser utilizado como una terapia anti-cáncer en pacientes con cáncer de hígado.

También se observó que el astemizol impide el desarrollo del CHC *in vivo*; esto fue evidente en evaluaciones cualitativas como los cambios histopatológicos y el aspecto macroscópico del hígado y mediante la evaluación cuantitativa de lesiones con actividad de la enzima GGT, un marcador tumoral comúnmente usado en hepatocarcinogénesis experimental y en diversos tumores epiteliales (Cameron et. al., 1978). Se utilizó el modelo de hepatocarcinogénesis inducida con DEN porque recapitula la formación secuencial de cirrosis y CHC multifocal, como suele ocurrir en un 80-90 % en los seres humanos (Schiffer et. al., 2005). El astemizol fue capaz de prevenir la formación de tumores cuando se administra ya sea desde el comienzo del tratamiento con DEN o desde la semana 12 cuando la cirrosis ya está presente. Estos resultados sugieren que el astemizol puede ser utilizado como un agente quimiopreventivo en pacientes en riesgo de desarrollar cáncer de hígado, por ejemplo, los pacientes con cirrosis hepática o infección por virus de la hepatitis. Este último caso, se mantiene para ser estudiado en el correspondiente modelo *in vivo*.

El efecto antineoplásico del astemizol se estudió posterior al establecimiento de hepatocarcinomas en ratas tratadas con DEN durante 16 semanas más 2 ó 6 semanas sin DEN. Las ratas tratadas con astemizol muestran una menor cantidad de nódulos con actividad de la enzima GGT, así como una mejoría de las características histológicas y el aspecto del hígado. Vale la pena mencionar que la actividad de la GGT fue incluso menor en el grupo tratado con astemizol por 4 semanas al final del tratamiento con DEN (tratamiento total de 22 semanas) que en el grupo tratado durante 16 semanas con DEN + 2 semanas sin DEN, por lo tanto, el astemizol también puede ser utilizado para evitar el crecimiento de los tumores en el hígado ya establecidos y disminuir la actividad de los marcadores tumorales del hígado. Debido a que en algunos casos los tumores hepáticos no son operables debido a su tamaño, el tratamiento con astemizol representa una alternativa potencial para disminuir el tamaño del tumor y hacer que los tumores del hígado sean operables.

Como se mencionó anteriormente, el astemizol tiene como blanco varias proteínas implicadas en el cáncer como la glicoproteína-P, la cual confiere resistencia a la quimioterapia en varios tipos de cáncer, incluyendo el CHC (Ishikawa et. al., 2000, Breier et. al., 2013). Por lo tanto, es concebible pensar en mejorar la terapia contra el cáncer con tratamientos combinados, un sensibilizador de células resistentes y el fármaco antitumoral. Así, si los fármacos anti-cáncer que son expulsados por la glicoproteína-P de la célula tumoral se utilizan en combinación con el astemizol, este podría hacer eficiente la actividad antitumoral. Esta idea ha sido evaluada previamente, el astemizol potencia la actividad inhibidora del crecimiento de la doxorubicina en las células de leucemia resistente a doxorubicina (Ishikawa et. al.,

2000). Se sugirió que este efecto es mediado a través de la inhibición de la actividad de la glicoproteína-P por el astemizol. Por lo tanto, el uso combinado del astemizol con fármacos quimioterapéuticos para mejorar los efectos anticáncer es también un enfoque potencial para el tratamiento del CHC.

En este estudio no se observó pérdida de peso o del apetito en los animales tratados con astemizol. Otro trabajo *in vivo* usando astemizol a la misma dosis (50 mg/kg/día) mostró que el astemizol inhibe el crecimiento tumoral de las células del cáncer de mama implantadas en los ratones sin producir efectos secundarios evidentes (Downie et. al., 2008). Esta dosis está muy por debajo de la dosis letal 50 del astemizol que es de 2052 mg/kg (DL50) indicada por el Drug Bank (García-Quiroz y Camacho, 2011). Debido a que los graves efectos adversos del astemizol se presentaban en casos de sobredosis (García-Quiroz y Camacho, 2011), el uso del astemizol podría ser seguro si se administran las dosis recomendadas y si la función cardíaca se monitorea durante el tratamiento.

Los canales Eag1 se han sugerido como posibles marcadores tumorales y dianas terapéuticas para diferentes tipos de cáncer (Pardo y Stuhmer, 2008, Wulff et. al., 2009, Pardo et. al., 1999, Rodríguez-Rasgado et. al., 2012), además, Eag1 se ha propuesto como un potencial marcador temprano de cáncer cervical, de cáncer de mama y de cáncer de colon (Hemmerlein et. al., 2006, Farías et. al., 2004, Ousingsawat et. al., 2007). En este mismo sentido, se ha encontrado que la expresión de Eag1 está regulada por oncogenes del VPH y el estradiol, y se ha detectado en lesiones cervicales pre-malignas (Díaz et. al., 2009, Ortiz et. al., 2011). En el presente trabajo se determinó la expresión de Eag1 en el modelo *in vivo* de CHC. Se observó una alta

expresión del mRNA de Eag1 en la mayoría de los grupos tratados con DEN así como el inmunomarcaje de Eag1 en las etapas tempranas del desarrollo del CHC. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren a Eag1 como un potencial marcador temprano para el CHC. La expresión de la proteína de Eag1 en el hígado de humanos podría ser seguida por técnicas de imagen, mediante el uso de anticuerpos marcados fluorescentemente y las técnicas de imágenes en el intervalo espectral del infrarrojo cercano. La expresión de la proteína de Eag1 ya se ha detectado *in vivo* en tumores no palpables mediante esta técnica (Pardo et. al., 2005). Este tipo de técnica podría también ser utilizada para buscar la expresión de Eag1 en el hígado de los pacientes en riesgo de desarrollar CHC e *in vivo* en el modelo utilizado aquí. De manera inesperada, no se encontró una elevada expresión de Eag1 en los hígados que presentaron CHC avanzado a las 22 semanas del inicio con el carcinógeno DEN, además, la expresión de Eag1 en el grupo tratado con astemizol fue ligeramente superior. Con el conjunto de datos obtenidos en el modelo animal es factible considerar que la expresión de Eag1 está más relacionada con los eventos tempranos del desarrollo de CHC. El papel exacto de Eag1 en el desarrollo de CHC queda por esclarecerse, esto podría llevarse a cabo de diferentes maneras. Recientemente, se han generado ratones knock-out para Eag1 (los animales no mostraron ninguna anomalía importante a nivel del sistema nervioso central (Ufartes et. al., 2013)), sería muy interesante investigar si estos ratones knock-out son capaces de desarrollar cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular bajo inducción con hepatotóxicos.

Debido al mal pronóstico del CHC avanzado, se necesita con urgencia nuevas alternativas terapéuticas. Nuestros resultados sugieren que el tratamiento con

astemizol puede ser una opción prometedora preventiva para los pacientes con riesgo de desarrollar CHC tales como los pacientes con cirrosis, así como una opción terapéutica esperanzadora. También se propone a Eag1 como posible marcador temprano de CHC. La detección temprana de los tumores hepáticos y una terapia y prevención con astemizol exitosa, podrían contribuir a reducir la mortalidad por esta enfermedad.

8. RESUMEN DE RESULTADOS.

- El astemizol disminuye la proliferación de líneas celulares de CaCu y de CHC, la imipramina no mostró efecto.
- El astemizol aumenta la apoptosis en líneas celulares de CaCu y CHC.
- El tratamiento con astemizol disminuye el desarrollo tumoral de manera preventiva administrado desde el inicio, como de manera terapéutica administrado en tumores establecidos.
- La expresión de Eag1 se encontró en el hígado con características de cirrosis y de lesiones nodulares tempranas, sin embargo, dicha expresión disminuye en las ratas con hepatocarcinoma avanzado.

9. CONCLUSIONES.

- El astemizol podría servir como una alternativa terapéutica para el cáncer cervical.
- Nuestros resultados sugieren que el astemizol podría funcionar como una opción prometedora preventiva para pacientes con riesgo de desarrollar CHC, así como el uso del mismo como tratamiento para los pacientes con CHC.
- Se propone a Eag1 como un potencial marcador temprano para CHC.
- La prevención y la terapia basada en el astemizol y la detección temprana de Eag1 podría ayudar a reducir la mortalidad por esta enfermedad.

10. REFERENCIAS.

Agarwal, J. R., F. Griesinger, W. Stuhmer and L. A. Pardo "The potassium channel Ether a go-go is a novel prognostic factor with functional relevance in acute myeloid leukemia." Mol Cancer. (2010);9:18.

Altekruse, S. F., K. A. McGlynn and M. E. Reichman. "Hepatocellular carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the United States from 1975 to 2005." J Clin Oncol. (2009) 27(9): 1485-1491.

Armstrong CM and B, Hille. Voltage-gated ion channels and electrical excitability. Neuron. (1998) 20: 371-380.

Asher, V., R. Khan, A. Warren, R. Shaw, G. V. Schalkwyk, A. Bali and H. M. Sowter "The Eag1 potassium channel as a new prognostic marker in ovarian cancer." Diagn Pathol. (2010);5:78.

Bauer, C. K. and J. R. Schwarz. "Physiology of EAG K⁺ channels." J Membr Biol. (2001) 182(1): 1-15.

Befeler, A. S. and A. M. Di Bisceglie. "Hepatocellular carcinoma: diagnosis and treatment." Gastroenterology. (2002) 122(6): 1609-1619.

Bianchi, L., B. Wible, A. Arcangeli, M. Taglialatela, F. Morra, P. Castaldo, O. Crociani, B. Rosati, L. Faravelli, M. Olivotto and E. Wanke. "herg encodes a K⁺ current highly conserved in tumors of different histogenesis: a selective advantage for cancer cells?" Cancer Res.(1998);58(4):815-22.

Brake T. and P. F. Lambert. Estrogen contributes to the onset, persistence, and malignant progression of cervical cancer in a human papillomavirus-transgenic mouse model. PNAS. (2005) 102:2490-2495.

Breier, A., L. Gibalova, M. Seres, M. Barancik and Z. Sulova. "New insight into p-glycoprotein as a drug target." Anticancer Agents Med Chem. (2013) 13(1): 159-170.

Cameron, R., J. Kellen, A. Kolin, A. Malkin and E. Farber. "Gamma-glutamyltransferase in putative premalignant liver cell populations during hepatocarcinogenesis." Cancer Res. (1978) 38(3): 823-829.

Denny, L. "Cervical cancer: prevention and treatment." Discov Med. (2012) 14(75): 125-131.

Díaz, L., I. Ceja-Ochoa, I. Restrepo-Angulo, F. Larrea, E. Ávila-Chávez, R. García-Becerra, E. Borja-Cacho, D. Barrera, E. Ahumada, P. Gariglio, E. Álvarez-Ríos, R. Ocadiz-Delgado, E. García-Villa, E. Hernández-Gallegos, I. Camacho-Arroyo, A. Morales, D. Ordaz-Rosado, E. García-Latorre, J. Escamilla, L. C. Sánchez-Pena, M. Saqui-Salces, A. Gamboa-Domínguez, E. Vera, M. Uribe-Ramírez, J. Murbartian, C. S. Ortiz, C. Rivera-Guevara, A. De Vizcaya-Ruiz and J. Camacho. "Estrogens and human papilloma virus oncogenes regulate human ether-a-go-go-1 potassium channel expression." Cancer Res. (2009) 69(8): 3300-3307.

Downie, B. R., A. Sánchez, H. Knotgen, C. Contreras-Jurado, M. Gymnopoulos, C. Weber, W. Stuhmer and L. A. Pardo. "Eag1 expression interferes with hypoxia homeostasis and induces angiogenesis in tumors." J Biol Chem. (2008) 283(52): 36234-36240.

El-Serag, H. B. and K. L. Rudolph. "Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis." Gastroenterology. (2007) 132(7): 2557-2576.

Farías, L. M., D. B. Ocana, L. Díaz, F. Larrea, E. Ávila-Chávez, A. Cadena, L. M. Hinojosa, G. Lara, L. A. Villanueva, C. Vargas, E. Hernández-Gallegos, I. Camacho-Arroyo, A. Duenas-González, E. Perez-Cardenas, L. A. Pardo, A. Morales, L. Taja-Chayeb, J. Escamilla, C. Sánchez-Pena and J. Camacho. "Ether a go-go potassium channels as human cervical cancer markers." Cancer Res. (2004) 64(19): 6996-7001.

Franco, E. L., E. Duarte-Franco and A. Ferenczy "Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection." CMAJ. (2001);164(7):1017-25.

García-Becerra, R., L. Díaz, J. Camacho, D. Barrera, D. Ordaz-Rosado, A. Morales, C. S. Ortiz, E. Ávila, E. Bargallo, M. Arrecillas, A. Halhali and F. Larrea. "Calcitriol inhibits Ether-a go-go potassium channel expression and cell proliferation in human breast cancer cells." Exp Cell Res. (2010) 316(3): 433-442.

García-Ferreiro, R. E., D. Kerschensteiner, F. Major, F. Monje, W. Stuhmer and L. A. Pardo. "Mechanism of block of hEag1 K⁺ channels by imipramine and astemizole." J Gen Physiol. (2004) 124(4): 301-317.

García-Quiroz, J. and J. Camacho. "Astemizole: an old anti-histamine as a new promising anti-cancer drug." Anticancer Agents Med Chem. (2011) 11(3): 307-314.

Gariglio Vidal P. *Biología Molecular del Cáncer* (capítulo 7). El cáncer en México. (2003) 175-234.

Gavrilova-Ruch, O., K. Schonherr, G. Gessner, R. Schonherr, T. Klapperstuck, W. Wohlrab and S. H. Heinemann. "Effects of imipramine on ion channels and proliferation of IGR1 melanoma cells." J Membr Biol. (2002) 188(2): 137-149.

Globocan 2008. International Agency for Research on Cancer. <https://globocan/iarc.fr>
Accessed 22.06.2013

Gómez-Varela, D., E. Zwick-Wallasch, H. Knotgen, A. Sánchez, T. Hettmann, D. Ossipov, R. Weseloh, C. Contreras-Jurado, M. Rothe, W. Stuhmer and L. A. Pardo. "Monoclonal antibody blockade of the human Eag1 potassium channel function exerts antitumor activity." Cancer Res. (2007) 67(15): 7343-7349.

Heinemann, S,H; H, Solveig. Voltage-gated Potassium Channels. Encyclopedia of Life Sciences Nature Publishing Group. (2001)1-8.

Heldring, N., A. Pike, S. Andersson, J. Matthews, G. Cheng, J. Hartman, M. Tujague, A. Strom, E. Treuter, M. Warner and J. A. Gustafsson. "Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets." Physiol Rev. (2007) 87(3): 905-931.

Hemmerlein, B., R. M. Weseloh, F. Mello de Queiroz, H. Knotgen, A. Sánchez, M. E. Rubio, S. Martin, T. Schliephacke, M. Jenke, R. Heinz Joachim, W. Stuhmer and L. A. Pardo. "Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours." Mol Cancer. (2006) 5: 41.

Hille, B. Ion Channels of Excitable Membranes. Third Edition (2001). Sinauer Associates, Inc. Massachusetts. USA.

Ishikawa, M., R. Fujita, M. Takayanagi, Y. Takayanagi and K. Sasaki. "Reversal of acquired resistance to doxorubicin in K562 human leukemia cells by astemizole." Biol Pharm Bull. (2000) 23(1): 112-115.

Kaplan, W. D. and W. E. Trout, 3rd. "The behavior of four neurological mutants of *Drosophila*." Genetics. (1969) 61(2): 399-409.

Lin, H., Z. Li, C. Chen, X. Luo, J. Xiao, D. Dong, Y. Lu, B. Yang and Z. Wang. "Transcriptional and post-transcriptional mechanisms for oncogenic overexpression of ether a go-go K⁺ channel." PLoS One. (2011);6(5):e20362.

Martínez Rosas M. Los Canales Iónicos: la Biología y Patología. Archivos de Cardiología de México (2004). Vol. 74(2).

Meyer, R., R. Schonherr, O. Gavrilova-Ruch, W. Wohlrab and S. H. Heinemann. "Identification of ether a go-go and calcium-activated potassium channels in human melanoma cells." J Membr Biol. (1999) 171(2): 107-115.

Napp, J. N-linked glycosylation of ether à go-go potassium channels: effects on cell surface expression and functional properties. PhD Thesis. (2003).

Occhiodoro, T., L. Bernheim, J. H. Liu, P. Bijlenga, M. Sinnreich, C. R. Bader and J. Fischer-Lougheed. "Cloning of a human ether-a-go-go potassium channel expressed in myoblasts at the onset of fusion." FEBS Lett. (1998) 434(1-2): 177-182.

Ortiz, C. S., D. Montante-Montes, M. Saqui-Salces, L. M. Hinojosa, A. Gamboa-Domínguez, E. Hernández-Gallegos, B. Martínez-Benítez, M. Del Rosario Solís-Pancoatl, E. García-Villa, A. Ramírez, R. Aguilar-Guadarrama, P. Gariglio, L. A. Pardo, W. Stuhmer and J. Camacho. "Eag1 potassium channels as markers of cervical dysplasia." Oncol Rep. (2011) 26(6): 1377-1383.

Ouadid-Ahidouch, H., X. Le Bourhis, M. Roudbaraki, R. A. Toillon, P. Delcourt and N. Prevarskaya. "Changes in the K⁺ current-density of MCF-7 cells during progression

through the cell cycle: possible involvement of a h-ether.a-gogo K⁺ channel." Receptors Channels. (2001) 7(5): 345-356.

Ousingsawat, J., M. Spitzner, S. Puntheeranurak, L. Terracciano, L. Tornillo, L. Bubendorf, K. Kunzelmann and R. Schreiber. "Expression of voltage-gated potassium channels in human and mouse colonic carcinoma." Clin Cancer Res. (2007) 13(3): 824-831.

Pardo, L. A. "Voltage-gated potassium channels in cell proliferation." Physiology (Bethesda). (2004) 19: 285-292.

Pardo, L. A., C. Contreras-Jurado, M. Zientkowska, F. Alves and W. Stuhmer. "Role of voltage-gated potassium channels in cancer." J Membr Biol. (2005) 205(3): 115-124.

Pardo, L. A., D. del Camino, A. Sánchez, F. Alves, A. Bruggemann, S. Beckh and W. Stuhmer. "Oncogenic potential of EAG K(+) channels." EMBO J. (1999) 18(20): 5540-5547.

Pardo, L. A. and W. Stuhmer. "Eag1: an emerging oncological target." Cancer Res. (2008) 68(6): 1611-1613.

Parkin, D. M. "Global cancer statistics in the year 2000." Lancet Oncol. (2001) 2(9): 533-543.

Parsons, M. E. and C. R. Ganellin. "Histamine and its receptors." Br J Pharmacol. (2006) 147 Suppl 1: S127-135.

Reynolds, J. L., J. Akhter and D. L. Morris. "In vitro effect of histamine and histamine H1 and H2 receptor antagonists on cellular proliferation of human malignant melanoma cell lines." Melanoma Res. (1996) 6(2): 95-99.

Rodríguez-Rasgado, J. A., I. Acuna-Macías and J. Camacho. "Eag1 channels as potential cancer biomarkers." Sensors (Basel). (2012) 12(5): 5986-5995.

Schiffer, E., C. Housset, W. Cacheux, D. Wendum, C. Desbois-Mouthon, C. Rey, F. Clergue, R. Poupon, V. Barbu and O. Rosmorduc. "Gefitinib, an EGFR inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis." Hepatology. (2005) 41(2): 307-314.

Suzuki, K. "Current therapeutic strategy for multiple myeloma." Ipn J Clin Oncol. (2013) 43(2): 116-124.

Tamargo Menéndez, J. Los poros y los canales iónicos regulan la actividad celular. Academia Nacional de Farmacia. (2004) 70: 9-31.

Ufartes, R., T. Schneider, L. S. Mortensen, C. de Juan Romero, K. Hentrich, H. Knoetgen, V. Beilinson, W. Moebius, V. Tarabykin, F. Alves, L. A. Pardo, J. N. Rawlins and W. Stuehmer (2013). "Behavioural and functional characterization of Kv10.1 (Eag1) knockout mice." Hum Mol Genet. (2013) 22(11):2247-62.

Weber, C., F. Mello de Queiroz, B. R. Downie, A. Suckow, W. Stuehmer and L. A. Pardo. "Silencing the activity and proliferative properties of the human EagI Potassium Channel by RNA Interference." J Biol Chem. (2006) 281(19): 13030-13037.

World Health Organization (WHO). Cervical Cancer Incidence in Mexico [<http://www.who.int/infobase/report.aspx?rid=119>]. Accessed April 11, 2013.

Wulff, H., N. A. Castle and L. A. Pardo "Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets." Nat Rev Drug Discov. (2009) 8(12):982-1001.

Xu, Y., L. Li, X. Xiang, H. Wang, W. Cai, J. Xie, Y. Han, S. Bao and Q. Xie. "Three common functional polymorphisms in microRNA encoding genes in the susceptibility to hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis." Gene. (2013) 527(2): 584-593.

zur Hausen, H. "Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application." Nat Rev Cancer. (2002) 2(5):342-50.