



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**“Expresión de canales iónicos en células de cáncer cervicouterino y  
su papel en la proliferación celular”**

**T E S I S**

**Que presenta**

**M. en C. ALMA YOLANDA VÁZQUEZ SÁNCHEZ**

**Para obtener el grado de**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA**

**Director de Tesis**

**Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo**

**Ciudad de México**

**ABRIL, 2017**

## **AGRADECIMIENTOS AL CONACYT**

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo número 322082 otorgado para realizar mis estudios de doctorado.

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias al Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo por aceptarme para ser parte de su equipo de trabajo, además de su paciencia, dedicación, motivación y aliento.

También agradezco enormemente a todos los integrantes del laboratorio 13 del Departamento de Farmacología, a las auxiliares M. en C. Elisabeth Hernández, a la Bióloga Eunice Vera y a Guadalupe Montiel por su valioso apoyo dentro del laboratorio.

A todas mis compañeras del laboratorio 13: Ana, Andrea Chiquinga, Andrea González, Aurora, Carolina, Gloria, Lupita y Violeta por hacer agradable mi estancia en el laboratorio y sobre todo, por su amistad.

## **DEDICATORIAS**

Quiero dedicar este trabajo con mucha gratitud y amor a mis padres Yolanda y Clemente por todo su apoyo y amor incondicional.

A mis hermanos Leticia, Gerardo, Gregorio, Rocío y Gabriela por ser una inspiración y ejemplo en mi formación.

También agradezco a mi novio, Juan Ángel Vargas Jacob por el amor, apoyo y motivación. Te amo infinitamente.

## INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1 Cáncer</b> .....	1
<b>1.2 Cáncer Cervicouterino</b> .....	2
<b>1.2.1 Infección por VPH</b> .....	3
<b>1.2.2 Factores de Riesgo</b> .....	4
<b>1.2.3 Diagnóstico</b> .....	5
<b>1.2.4 Estadio Clínico</b> .....	6
<b>1.2.5 Tratamiento</b> .....	7
<b>1.3 Canales Iónicos</b> .....	8
<b>1.3.1 Canales de Potasio</b> .....	8
<b>1.3.1.1 Canales de K<sup>+</sup> sensibles a ATP (K<sub>ATP</sub>)</b> .....	9
<b>1.3.2 Canales TRPs</b> .....	12
<b>1.3.2.1 TRPC6</b> .....	13
<b>1.3.3 Canales Iónicos en Cáncer Cervicouterino</b> .....	15
<b>1.3.3.1 Canales de cloruro (Cl<sup>-</sup>)</b> .....	15
<b>1.3.3.2. Receptores purinérgicos</b> .....	16
<b>1.3.3.3 Canales de Na<sup>+</sup></b> .....	16
<b>1.3.3.4 Canales de K<sup>+</sup></b> .....	17
<b>1.3.3.4.1 Kv10.1</b> .....	17
<b>1.3.3.4.2 Canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje de gran conductancia</b> .....	18
<b>1.3.3.5 TRPC6</b> .....	18
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	18
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	19
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	19
<b>4.1 OBJETIVO GENERAL</b> .....	19
<b>4.2 OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	20
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	20
<b>5.1 Líneas celulares</b> .....	20
<b>5.1.1 Inmunocitoquímica</b> .....	20

5.1.2 Actividad metabólica (ensayo MTT) .....	21
5.1.3 Apoptosis.....	21
5.2 Muestras de Pacientes.....	22
5.2.1 Consideraciones éticas .....	22
5.2.2 Muestras biológicas.....	22
5.2.3 Inmunohistoquímica .....	23
5.3 Estudios de Expresión Génica.....	23
5.3.1 Extracción de RNA .....	23
5.3.2 Purificación del RNA con DNasa.....	24
5.3.3 Obtención del cDNA .....	24
5.3.4 PCR en tiempo real empleando sondas Taqman .....	25
5.8 Análisis Estadístico .....	25
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>26</b>
6.1. Determinar la expresión a nivel de mRNA de los canales iónicos a estudiar .....	26
6.2 Canales Kir6.2.....	27
6.2.1 Expresión diferencial de los canales Kir6.2 en las líneas celulares de cáncer cervicouterino.....	27
6.2.2 La glibenclamida disminuye la proliferación de las células HeLa y de los queratinocitos normales .....	28
6.2.3 Expresión del mRNA de Kir6.2 en biopsias humanas y su potencial asociación con la diferenciación tumoral y la invasión .....	30
6.2.4 Expresión de los canales $K_{ATP}$ en tejidos humanos cervicales.....	31
6.3 Canales TRPC6 .....	34
6.3.1 Expresión de los canales TRPC6 en las líneas celulares de cáncer cervicouterino.....	34
6.3.2. El gen de los canales TRPC6 se encuentran hipermetilados en las células CaSki y SiHa.....	35
6.3.3. Expresión de los canales TRPC6 en biopsias de cáncer cervicouterino.....	36
<b>7. DISCUSIÓN .....</b>	<b>38</b>
<b>8. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>43</b>
<b>9. FIGURAS COMPLEMENTARIAS.....</b>	<b>44</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>45</b>

## RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es uno de los tipos de cáncer ginecológico más frecuentes a nivel mundial. En México, el CaCu representa la segunda causa de muerte por neoplasias malignas en la mujer. La mayor parte de los casos siguen siendo frecuentemente diagnosticados en etapas tardías, cuando los tratamientos convencionales como la radioterapia y quimioterapia ofrecen una actividad terapéutica limitada, por lo que es esencial seguir investigando nuevos blancos terapéuticos para combatir dicha enfermedad. Dentro de este campo, destacan los canales iónicos, ya que en años recientes se ha demostrado su relación con prácticamente todos los procesos característicos del cáncer. Por lo anterior, en este trabajo se decidió evaluar la expresión de diversos canales iónicos de  $K^+$  y de  $Ca^{2+}$  a nivel de mRNA mediante PCR- en tiempo real y de proteína mediante inmunocitoquímica/inmunohistoquímica en líneas celulares de cáncer cervical, en muestras de tejido de pacientes que padecen cáncer cervicouterino y en cultivos primarios; así como evaluar el efecto de inhibidores de algunos de estos canales sobre la proliferación y la apoptosis mediante ensayos de actividad metabólica y experimentos por citometría de flujo, respectivamente. En nuestros resultados destaca la expresión de los siguientes canales iónicos: 1) Los canales  $K_{ATP}$  se encontraron sobreexpresados en la mayor parte de las muestras de pacientes analizadas. La expresión más alta fue detectada en las biopsias de pacientes que correspondían a los estadios clínicos más avanzados del carcinoma cervical, a pacientes con tumores invasores y a pacientes clasificadas con grados de diferenciación moderadamente y pobremente diferenciados, mientras que en las muestras de tejidos cervicales no cancerosos no se detectó la presencia de dichos canales. Asimismo, el uso de glibenclamida, un bloqueador selectivo de los canales  $K_{ATP}$  disminuyó la proliferación de las células HeLa. Sin embargo, dicho efecto no se relacionó con la inducción de la apoptosis. 2) Los canales TRPC6 se encontraron prácticamente ausentes en la mayoría de las líneas celulares, cultivos primarios y biopsias de pacientes con CaCu. Sin embargo, después de someter a las líneas celulares y cultivos primarios a un tratamiento con un agente desmetilante global, se pudo detectar la reexpresión de los canales TRPC6 solamente en las células CaSki y SiHa. Por otro lado, en el 50% de las muestras de tejido de pacientes con cáncer cervical se detectó inmunotinción positiva, indicando la presencia de la proteína de dichos canales, sin embargo, en todos

los casos, la señal fue de menor intensidad con respecto al tejido control, en dónde siempre se detectó una señal muy intensa.

En conclusión, nuestros resultados sugieren a los canales  $K_{ATP}$  y TRPC6 como potenciales herramientas para el diagnóstico, el pronóstico y la terapia del cáncer cervicouterino. Los canales  $K_{ATP}$  pueden ser las bases para una nueva intervención terapéutica en las pacientes con cáncer cervical que sobreexpresen dichas proteínas. Mientras que los canales TRPC6 pudieran estar desempeñando un papel muy importante para el desarrollo y progresión del cáncer cervicouterino y pudieran ser considerados como posibles genes supresores de tumores en este tipo de cáncer.

## ABSTRACT

Cervical cancer is one of the most common gynecological cancers worldwide. In Mexico, cervical cancer is the second leading cause of death from malignant neoplasms in women. Most patients are diagnosed at advanced stages of the disease when conventional therapies such as radiotherapy and chemotherapy have limited efficacy. Thus, it is very important to investigate new possible therapies against cervical cancer. Ion channels represent a promising area because their relationship with all the hallmarks of cancer has been shown. Therefore, here in we studied different  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  channels mRNA and protein expression in human cervical cancer cell lines and biopsies by real-time RT-PCR and immunochemistry/immunocytochemistry, respectively. The effect of some selective channel blockers on proliferation and apoptosis of cervical cancer cells was also studied by metabolic activity assays and flow cytometry, respectively. Our results focused on the pattern expression of the following ion channels: 1) The  $K_{ATP}$  channel overexpression was observed in cervical cancer cell lines and tumor tissues. The higher expression was potentially associated with the most advanced clinical stages, invasion and moderately with poorly tumor differentiation grade. No  $K_{ATP}$  channel expression was observed in most of the non-cancerous cervical tissues. Likewise, glibenclamide, a selective blocker of  $K_{ATP}$  channels, decreased HeLa cell proliferation. Nevertheless, the antiproliferative effect of glibenclamide was not related to apoptosis. 2) TRPC6 channels were undetectable in most of the cell lines, primary cultures and biopsies of cervical cancer patients. However, after the treatment of the cell cultures with a demethylating agent, the reexpression of TRPC6 channels only on CaSki and SiHa cells could be detected. Furthermore, TRPC6 immunolabeling was detected in 50% of the tissue samples from cervical cancer patients, but in all cases, the signal was less intense compared to the control tissue, in which, a very strong signal was always detected.

In conclusion, our results suggest  $K_{ATP}$  and TRPC6 channels as potential tools for cervical cancer diagnosis, prognosis and therapy.  $K_{ATP}$  channels may be the basis for a novel therapeutic intervention for cervical cancer patients overexpressing this protein. TRPC6 channels may play a role in cancer development and progression and they might be considered as possible tumor suppression genes in cervical cancer.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Cáncer

El cáncer es una enfermedad que involucra cambios dinámicos en el genoma que producen fallas en la regulación de la homeostasis celular, haciendo que células normales se transformen en malignas, células que exhiben una proliferación y una propagación incontroladas. Existen más de 100 distintos tipos de cáncer, definidos por genotipos específicos, que pueden ser caracterizados en diez fenotipos patofisiológicos que definen su crecimiento maligno: 1) **Señales de crecimiento auto-suficientes**, las células cancerosas pueden adquirir la capacidad de mantener las señales de proliferación mediante diferentes estrategias como por ejemplo, producir sus propios ligandos para los receptores de factores de crecimiento, favoreciendo a su vez, la expresión de receptores afines y estimulando la proliferación autócrina. También pueden estimular a las células normales del estroma que rodea al tumor para que produzcan factores de crecimiento; además, existen alteraciones estructurales de los receptores que facilitan su activación independientemente del estímulo del ligando. 2) **Insensibilidad a las señales de anticrecimiento**, las estrategias que usan las células cancerosas para evadir la regulación negativa de la proliferación celular se basan principalmente en la inactivación de genes supresores de tumores como p53 y Rb. 3) **Evasión de la apoptosis**, se ha demostrado una correlación entre la atenuación de la apoptosis y la progresión tumoral debida principalmente a una sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2. 4) **Potencial de replicación ilimitado**, esta característica se relaciona ampliamente con la sobreexpresión de la telomerasa (encontrada en aproximadamente el 90% de las células inmortalizadas, incluyendo las cancerosas) que correlaciona con la resistencia a la senescencia y apoptosis. 5) **Angiogénesis sostenida**, en contraste con las células normales, en las cancerosas, la vía angiogénica siempre está activa para contribuir con el crecimiento neoplásico, proteínas como VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) se han visto reguladas a la alta por hipoxia y por señales oncogénicas, también se ha demostrado que pueden ser secuestradas en la matriz extracelular y mantenerse allí de forma latente hasta que son liberadas proteasas que degradan la matriz extracelular. También se ha determinado la sobreexpresión de proteínas proangiogénicas como FGF (factor de crecimiento de fibroblastos). 6) **Invasión tisular y metástasis**, se caracteriza por la pérdida de moléculas de adhesión celular como la E-caderina y con la sobreexpresión de proteínas de adhesión normalmente asociadas con la migración celular que ocurre durante la

embriogénesis e inflamación como la N-caderina. 7) **Inestabilidad genómica y mutaciones**, en numerosos cánceres se han demostrado aberraciones genómicas como la pérdida o ganancia en el número de copias de ciertos genes. 8) **Inflamación**, algunos tumores se encuentran densamente infiltrados con células del sistema inmune e inflamatorias. La inflamación asociada al tumor facilita la progresión tumoral porque las células inflamatorias pueden reclutar moléculas como ligandos de factores de crecimiento y factores proangiogénicos. 9) **Reprogramación del metabolismo celular**, el metabolismo energético en las células cancerosas se ajusta para poder aportar la energía necesaria para la proliferación sostenida, haciendo más activa la vía glucolítica. 10) **Evasión del sistema inmune**, un sistema inmune competente actúa como barrera de protección para el desarrollo y la progresión del cáncer [1].

## 1.2 Cáncer Cervicouterino

A nivel mundial, el cáncer cervicouterino (CaCu) es uno de los cánceres más comunes en mujeres, además, de ser uno de los más mortales. Se estima que alrededor de 0.25 millones de mujeres mueren cada año a causa del CaCu, representando así, la segunda causa de muerte por neoplasias malignas en la mujer. El desarrollo del CaCu es atribuido en la mayoría de los casos (99.7%) a una infección persistente del Virus de Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo, transmitidos por vía sexual [2]. Existen más de 100 tipos de VPH, de los cuales aproximadamente 25 infectan el tracto genital. Se clasifican de bajo o alto riesgo de acuerdo a su repercusión en el grado de invasión de los tumores. Los tipos de VPH que son encontrados preferentemente en el CaCu y en algunos otros tipos de cánceres anogenitales han sido designados como de alto riesgo, también llamados oncogénicos. Algunos tipos de VPH de alto riesgo son los tipos 16, 18, 45, 31 y 33 por mencionar algunos. Dichos tipos de alto riesgo se encuentran ampliamente distribuidos en todas las poblaciones humanas y sus oncoproteínas tienen una mayor afinidad por p53 y pRB. Mientras que los tipos de VPH de bajo grado, también conocidos como no oncogénicos, son aquellos que se encuentran principalmente en las verrugas genitales y en lesiones no malignas, algunos ejemplos de VPH de bajo grado los constituyen los tipos 42, 44, 51, 53 y 83 [3].

Existen 2 tipos de CaCu, el de células escamosas, que representa el tipo más común y que está mayormente asociado a una infección por VPH 16 y el adenocarcinoma, que es de origen

glandular y representa un 10% de los casos diagnosticados y está frecuentemente asociado a una infección por VPH 18.

### **1.2.1 Infección por VPH**

El VPH es un virus de doble cadena de ADN que pertenece a la familia *Papillomaviridae* que se replica exclusivamente en el epitelio escamoso estratificado y que se transmite por contacto sexual. El genoma del VPH se divide en 3 regiones: 1) región larga de control (LCR), la cual es una región regulatoria no codificante; 2) región que codifica para las proteínas tempranas (E1-E8) relacionadas con la replicación viral y la oncogénesis; 3) región que codifica para las proteínas tardías (L1 y L2), proteínas estructurales indispensables para la formación de la cápside viral. Durante la fase aguda de la infección por VPH, los viriones penetran al epitelio a través de microabrasiones infectando a las células madre localizadas en la capa basal epitelial. Después de la infección y desensamble en las células basales y en su progenie (las células amplificadoras transitorias), se expresan las proteínas virales E1 y E2 que facilitan que los viriones repliquen su ADN episomalmente. La expresión de otras proteínas virales como E6 y E7 retrasan el arresto del ciclo celular y la diferenciación, la cual es normalmente observada como una migración de las células epiteliales de la capa basal hasta convertirse en queratinocitos maduros [4]. La principal función de E6 es el bloqueo de la apoptosis mediante la degradación de p53 [5], mientras que la principal función de E7 es unirse a la forma hipofosforilada de pRB, alterando su estado de fosforilación. La unión de E7 a pRB provoca la liberación del factor de transcripción E2F-1, favoreciendo la transcripción de genes relacionados con la entrada a la fase S del ciclo celular y promoviendo así, la progresión del ciclo celular [6]. El retraso en el arresto del ciclo celular permite la replicación viral episomal adicional usando la propia maquinaria de replicación del ADN en las células epiteliales suprabasales, provocando el engrosamiento de la piel (verrugas). Cuando la diferenciación de las células epiteliales a queratinocitos maduros ocurre, las proteínas virales L1 y L2 (proteínas de la cápside), se ensamblan en el núcleo. Los viriones maduros son ensamblados y liberados del epitelio dentro de las células superficiales epiteliales. La infección con VPH de alto riesgo frecuentemente provoca la integración del episoma viral dentro del ADN de las células huésped, conservando la capacidad proliferativa, pero con la tendencia de desarrollar y perpetuar mutaciones en el ADN que provocan defectos en la diferenciación celular, la inmortalización y la inestabilidad cromosómica, contribuyendo a que las células se vuelvan displásicas [4].

En la mayoría de los casos, las lesiones displásicas en el epitelio cervical pueden revertirse espontáneamente, por la respuesta inmune del organismo. Aproximadamente un 25% de las mujeres jóvenes que adquieren una infección por VPH desarrollarán una lesión intraepitelial de bajo grado (LSIL). Posteriormente, sólo del 20 al 40% de estas LSIL progresarán a lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL). Sin embargo, si el VPH es capaz de evadir la respuesta inmune de las células hospederas, la infección persiste y maligniza [7].

### 1.2.2 Factores de Riesgo

Los principales factores de riesgo para el desarrollo del CaCu se relacionan con la posibilidad de contraer VPH, sin embargo, el VPH se considera como una causa necesaria, mas no suficiente para el desarrollo del CaCu, ya que se incluyen otros cofactores, los cuales se enlistan a continuación [4, 8, 9]:

- **Promiscuidad:** existe una asociación entre un mayor número de parejas sexuales y la adquisición de VPH.
- **Actividad sexual a temprana edad:** se sugiere que la infección por VPH se lleva a cabo a una edad temprana y que la progresión hacia el desarrollo del cáncer se da de una manera lenta, ya que la infección es más común en mujeres jóvenes sexualmente activas, sin embargo, el diagnóstico del CaCu es más común después de los 35 años.
- **Historial de otras enfermedades de transmisión sexual:** principalmente infecciones con *Chlamydia trachomatis*.
- **Persistencia viral:** es común entre los tipos virales de alto riesgo y constituye un factor determinante en el desarrollo del cáncer. La persistencia puede inducir cambios genéticos secundarios en las células, así como la inmortalización de los queratinocitos.
- **Uso prolongado de anticonceptivos orales:** el VPH contiene dentro de su genoma viral elementos de respuesta a glucocorticoides, inducibles por hormonas esteroideas como la progesterona (componente activo de los anticonceptivos orales) que pueden estimular la transcripción del VPH.
- **Coinfección con otros virus:** se ha postulado que la presencia de otros virus como el virus del herpes simple tipo 2, citomegalovirus y los herpes virus humanos tipos 6 y 7, los

cuales pueden ser fuente de oncogenes y factores transformantes adicionales a los del VPH puede contribuir de manera importante para el desarrollo del CaCu.

- **Carga viral:** correlaciona directamente con la persistencia de la infección, la progresión y la severidad de la enfermedad.
- **Predisposición genética:** la herencia aumenta la susceptibilidad a la infección por VPH, así como la capacidad para contrarrestarla y el tiempo de desarrollo de la enfermedad.
- **Fumar:** los componentes mutagénicos del cigarro pueden inducir inmunosupresión en las células cervicales lo que puede contribuir a la persistencia viral o la transformación maligna.

### 1.2.3 Diagnóstico

Tanto las displasias como los cambios epiteliales por VPH pueden ser identificados por medio de citología cervical y deben ser confirmados mediante colposcopia y toma de biopsia. Como técnicas complementarias a la citología para el diagnóstico del CaCu, se tienen las técnicas de detección de VPH como el ensayo de captura de híbridos. Sin embargo el diagnóstico definitivo de esta neoplasia se realiza en base a un análisis histopatológico mediante una biopsia dirigida, ya sea mediante colposcopia, en caso de no existir una lesión aparente o toma directa si el tumor es visible [10].

### 1.2.4 Estadío Clínico

De acuerdo a la última modificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO), en el año 2009 [11], la estadificación se resume en la Tabla 1:

Tabla 1. **Estadificación del CaCu.** Estadificación clínica del CaCu basada en los lineamientos de FIGO.

Etapa	Descripción
<b>I</b>	Tumor confinado al cuello uterino.
A	Tumor con invasión con una profundidad máxima de 5 mm medida desde la capa basal y una extensión horizontal.
A1	Invasión estromal $\leq 3$ mm y extensión horizontal $\leq 7$ mm.
A2	Invasión estromal $> 3$ mm, pero menor a 5 mm y extensión horizontal $\leq 7$ mm.
B	Tumor clínicamente visible confinado al cérvix o en etapas pre-clínicas mayores al estadio IA.
B1	Lesión clínicamente visible $\leq 4$ cm en su eje mayor.
B2	Lesión clínicamente visible $> 4$ cm en su eje mayor.
<b>II</b>	Tumor que se extiende más allá del cérvix sin llegar a la pared pélvica o el tercio inferior de la vagina.
IA	Tumor que invade los fondos del saco vaginal sin invasión parametrial.
IA1	Tumor $< 4$ cm.
IA2	Tumor $> 4$ cm.
IB	Tumor con invasión parametrial, pero sin llegar a la pared pélvica.
<b>III</b>	El tumor se extiende hacia la pared pélvica, y/o involucra el tercio inferior de la vagina y/o causa hidronefrosis, riñón excluido o disfunción renal.
IIA	El tumor involucra el tercio inferior de la vagina y no se extiende a la pared pélvica.
IIB	El tumor se extiende hacia la pared pélvica, y/o causa hidronefrosis, riñón excluido o disfunción renal.
<b>IV</b>	El tumor se extiende fuera de la pelvis.
VA	El tumor invade la mucosa de la vejiga o recto.
VB	Metástasis a distancia.

### 1.2.5 Tratamiento

El tratamiento más frecuente para el CaCu se basa en la cirugía (histerectomía) o radioterapia (braquiterapia o radioterapia externa) con quimioterapia (cisplatino, gemcitabina) adyuvante, pero dependerá del estadio clínico en el cual sea diagnosticada la enfermedad [12]. En la tabla 2 se resumen las opciones disponibles de tratamiento de acuerdo a su estadio clínico.

Tabla 2. **Tratamiento del CaCu de acuerdo al estadio clínico.** El manejo clínico del CaCu se basa en el estadio clínico en el cuál es diagnosticado.

Tratamiento	Estadio Clínico	Supervivencia (%)
Conización cervical-histerectomía tipo I	IA1	99 – 100
Histerectomía radical tipo II (extirpación adicional del tercio superior de la vagina y de la mitad medial de los ligamentos cardinales y uterosacros).	IA2	85 - 90
Histerectomía radical tipo III (extirpación adicional del tercio superior de la vagina y de la totalidad de los ligamentos cardinales y uterosacros) y radioterapia adyuvante para aquellas pacientes con riesgo de recurrencia.	IB-IIA	85 - 90
Quimio-radioterapia concomitante.	IIB2-IVA	60 - 70
Tratamiento paliativo.	IVB	13

La supervivencia de las pacientes está determinada por el estadio en el cual se diagnostica la enfermedad. Aproximadamente el 95% de las mujeres diagnosticadas con CaCu sobrevivirán a los 5 años cuando el cáncer se diagnostica en etapas en las que se encuentra bien localizado, mientras que sólo un 13% sobrevivirá cuando el cáncer ya ha hecho metástasis [12-14]. Por otro lado, cuando el CaCu es diagnosticado en etapas tempranas, la recurrencia se presentará en menos del 10% de los casos, mientras que en pacientes con la enfermedad localmente avanzada la recurrencia se presenta hasta en un 33% de las pacientes [15, 16].

Más del 80% de los casos de Ca Cu son diagnosticados en países subdesarrollados en donde existen carencias tanto en los métodos de detección oportuna como en el tratamiento óptimo[7] lo cual disminuye la supervivencia de estas pacientes. Particularmente en nuestro país, las etapas localmente avanzadas (estadios IIB-IVA) son los que tienen mayor prevalencia, tal como ocurre en otros países subdesarrollados [12]. Adicionalmente a los efectos adversos severos de la terapia convencional contra el cáncer, los tratamientos actuales ofrecen una baja tasa de

sobrevivencia y un pronóstico muy limitado por lo que es esencial seguir investigando nuevos blancos terapéuticos para combatir el cáncer. Dentro de este campo, destacan los canales iónicos, ya que en años recientes se ha demostrado su relación con prácticamente todos los procesos característicos del cáncer.

### **1.3 Canales Iónicos**

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana que controlan el flujo de iones como sodio ( $\text{Na}^+$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ), cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) y calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) entre el citoplasma y el espacio extracelular, a favor de su gradiente electroquímico. Los canales iónicos son proteínas dinámicas que pueden estar en al menos una de las siguientes conformaciones: conductora (abierta) y no conductora (cerrada o inactivada) en respuesta a estímulos específicos, lo que les permite controlar el flujo selectivo de iones, reaccionar a las características físicas y químicas del medio circundante y detectar diversas señales regulatorias. Existen muchos tipos de canales iónicos, pero usualmente se clasifican de acuerdo al estímulo que permite que estos se activen, por ejemplo, existen canales activados por voltaje, canales activados por ligando, canales mecanosensibles y canales activados por temperatura. Los canales iónicos contribuyen a la regulación de prácticamente todos los procesos celulares, incluyendo aquellos que son cruciales para el mantenimiento de la homeostasis celular como la proliferación, diferenciación y apoptosis. Una función anormal de los canales de potasio contribuye al desarrollo de diferentes enfermedades conocidas como canalopatías, entre las que destacan la epilepsia y la arritmia cardíaca [17, 18]. Diversos estudios han demostrado que la expresión y actividad de diferentes canales iónicos está asociada con la progresión tumoral de diversos tipos de cáncer y que el bloqueo de la actividad de algunos canales iónicos disminuye el crecimiento de ciertos tipos de tumores, tanto *in vitro* como *in vivo*, representando un amplio panorama para la investigación farmacéutica [19].

#### **1.3.1 Canales de Potasio**

Los canales de  $\text{K}^+$  son proteínas transmembranales que controlan el flujo de iones potasio a favor de su gradiente electroquímico a través de la membrana. Los canales de potasio

representan la familia más diversa de canales iónicos, concretamente, 78 miembros integran dicha familia, son codificados por más de 75 genes diferentes y se dividen en las 4 siguientes clases de acuerdo a su estructura y mecanismos de activación: canales activados por voltaje ( $K_v$ ), que son activados por cambios en el potencial de membrana; canales activados por calcio ( $K_{Ca}$ ); canales de rectificación entrante ( $K_{ir}$ ), que son canales en donde el flujo de  $K^+$  se favorece hacia al interior de la célula más que hacia el exterior, y canales con 2 poros ( $K_2P$ ), que tienen 2 dominios de poro por cada subunidad alfa [20].

Los canales de  $K^+$  son ubicuos y regulan múltiples funciones en células excitables y no excitables como el mantenimiento del potencial de reposo de membrana, la excitabilidad neuronal y la contracción muscular. Por otro lado, evidencias recientes muestran que los canales de potasio regulan procesos celulares como la migración y proliferación, por lo que se sugiere una relación entre el desarrollo del cáncer y una expresión aberrante de algunos canales de potasio [21-23]. Particularmente, diversos moduladores de la actividad de los canales de potasio han mostrado cierta eficacia antitumoral [20, 24].

#### **1.3.1.1 Canales de $K^+$ sensibles a ATP ( $K_{ATP}$ )**

Los canales  $K_{ATP}$  pertenecen a la familia de canales rectificantes entrantes que son inhibidos de manera fisiológica por ATP intracelular mientras que son activados por nucleósidos difosfatos (NDPs). Uno de los mayores componentes del mecanismo de rectificación se relaciona con el bloqueo de la región del poro por poliaminas o magnesio ( $Mg^{2+}$ ) a voltajes cercanos al potencial de inversión [25]. Sin embargo, a pesar del nombre de rectificantes entrantes, los canales  $K_{ATP}$  facilitan el flujo de  $K^+$  hacia el exterior de la célula y tienden a conducir el potencial de membrana hacia el potencial de equilibrio del  $K^+$  [26]. Por otro lado, ciertos fármacos derivados de los benzopiranos (cromakalima, levcromakalima y pinacidil), de las pirimidinas (minodixil) y de las benzotiadiazinas (diazóxido) actúan como activadores de los canales  $K_{ATP}$ , mientras que las sulfonilureas como la tolbutamida y la glibenclamida actúan como inhibidores. Los canales  $K_{ATP}$  constituyen un hetero-octámero, formado por 2 tipos de subunidades estructuralmente distintas: 4 subunidades de  $K_{ir}$  ( $K_{ir6.1}$  ó  $K_{ir6.2}$ ), que son las que forman el poro del canal y son las responsables de la permeabilidad al  $K^+$  y 4 subunidades de receptores de sulfonilureas (SUR), que son determinantes para la sensibilidad a los nucleótidos,

así como de la farmacología de los canales. Los receptores de sulfonilureas forman parte de la súper familia de *ATP-binding cassette* (ABC), a su vez, se han indentificado 3 tipos de receptores de sulfonilureas, SUR1, SUR2A y SUR2B [27-30]. El SUR1 se encuentra principalmente en las células  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\delta$ - pancreáticas, en el cerebro y otras células neuroendócrinas y se une con gran afinidad a las sulfonilureas. Por su parte, ambos tipos del SUR2 se consideran como receptores de baja afinidad y difieren en los últimos 45 residuos aminoacídicos que los conforman y se expresan abundantemente en células del músculo cardiaco, esquelético y músculo liso vascular y no vascular [25].

Los diferentes tipos de subunidades de Kir pueden interactuar con las diferentes subunidades de SUR formando diversos subtipos de canales con diferentes patrones de expresión en varios órganos, así como con funciones específicas como se resume en la tabla 3:

Tabla 3. **Características de los canales  $K_{ATP}$ .** Los canales  $K_{ATP}$  pueden formarse por una combinación de una subunidad tipo Kir y otra SUR, las diferentes combinaciones dan origen a canales con propiedades y patrones de expresión diferentes.

Tipo de Subunidad Kir	Tipo de Subunidad SUR	Tejido Expresado	Características	Referencias
Kir6 .1	SUR 2B	Músculo liso vascular	Sensible a sulfonilureas y a activadores, pero no a ATP.	[27, 29, 31]
Kir6 .2	SUR 1	Páncreas y Sistema Nervioso	Sensible a sulfonilureas a muy bajas concentraciones ( $IC_{50}$ Glibenclamida = 1 $\eta$ M).	[29, 31, 32]
Kir6 .2	SUR 2A	Músculo cardiaco y esquelético	$IC_{50}$ Glibenclamida es 10 veces más alta.	[29, 31, 32]
Kir6 .2	SUR 2B	Músculo liso y Sistema Nervioso		[29, 31, 32]

Los canales  $K_{ATP}$  se identificaron por primera vez en tejido de músculo cardiaco en donde se encargan del acortamiento de la fase de meseta del potencial de acción ventricular [33]. Más tarde dichos canales fueron encontrados en otros tejidos como páncreas, músculo esquelético, músculo liso vascular y no vascular. Particularmente, en el endotelio vascular cerebral se sabe que los canales  $K_{ATP}$  se encargan de regular el tono vascular y de mediar la relajación de los

vasos sanguíneos ante diversos estímulos en condiciones normales y patológicas como en la hipoxia [34]. También se ha demostrado que los canales  $K_{ATP}$  juegan un papel relevante en la motilidad intestinal [17]. Mientras que, en las neuronas, la apertura de los canales  $K_{ATP}$  reduce la frecuencia de los potenciales de acción, por lo que se les atribuye cierta función protectora contra el envejecimiento. Sin embargo, es en las células  $\beta$ -pancreáticas de los islotes de Langerhans en donde los canales  $K_{ATP}$  ejercen su función más representativa. El incremento en los niveles intracelulares de ATP provocado por un aumento en la concentración de glucosa causa el cierre de los canales, produciendo así la despolarización de la membrana plasmática, la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje y la secreción de insulina. Por lo anterior, este tipo de canales representan un vínculo entre el metabolismo y la excitabilidad celular [29, 31, 35].

Por otro lado, se ha relacionado a los canales  $K_{ATP}$  con el control del crecimiento y la proliferación de diferentes tipos celulares. Por ejemplo, activadores de canales  $K_{ATP}$  como el minodixil, cromakalima y pinodicil incrementan la síntesis de ADN de células de cultivos primarios de hepatocitos de rata, mientras que bloqueadores de canales  $K_{ATP}$  como la quinidina y la glibenclamida atenúan la síntesis del ADN de dichas células [36]. De manera importante, una expresión anormal de los canales  $K_{ATP}$  ha sido identificada en diferentes tipos de cáncer. A nivel de líneas celulares se ha demostrado la presencia de canales  $K_{ATP}$  funcionales en células de meduloblastoma humano (TE671) [37]; vejiga humana (HTB-9) [38]; cáncer de mama (MDA-MB-231) [39]; cáncer gástrico (MGC-803) [40] y en células de glioma (U87 y U251) [41].

Por otro lado, existen evidencias que muestran que la glibenclamida, un bloqueador de los canales de  $K_{ATP}$ , puede suprimir la proliferación celular, aunque el mecanismo involucrado aún no se encuentra del todo claro. Por ejemplo, en líneas celulares de cáncer de próstata, independientes de andrógenos (PC3 y DU145) y sensibles de andrógenos (LNCaP y MDA-PCA-2B) la administración de glibenclamida disminuye la proliferación celular [42]. Por un lado, se ha demostrado que la reducción de la tasa de crecimiento celular ejercida por la glibenclamida se debe a un arresto de las células en la fase G0/G1, inhibiendo así, la progresión del ciclo celular [38, 39]. En algunos casos, también se ha demostrado un efecto sobre la regulación de los niveles de p27 y la disminución en la expresión de la ciclina E [39]. Por otro lado, hay evidencias que señalan que la glibenclamida disminuye la proliferación celular al ejercer un efecto proapoptótico como se ha demostrado en las células de insulinooma de rata, RINm5F, en donde la glibenclamida

disminuyó la viabilidad celular, de manera dependiente de la concentración probada ( $10^{-7}$  hasta  $10^{-4}$  M), este efecto se ve acompañado por un incremento en la muerte celular por apoptosis [43]. Así mismo, en las células humanas MGC-803 provenientes de cáncer gástrico, la glibenclamida disminuye la viabilidad celular, efecto relacionado con la inducción de apoptosis y generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), así como con la activación de la vía de JNK e inhibición de la vía de Akt [40]. Las evidencias anteriores señalan el potencial uso de la glibenclamida para el tratamiento de diferentes tipos de cánceres.

Experimentos *in vivo*, han demostrado que en tumores cerebrales los canales  $K_{ATP}$  se encuentran sobre expresados en comparación con el tejido normal cerebral, a nivel de mRNA y de proteína. En este tipo de tumores los canales  $K_{ATP}$  han sido identificados tanto en el endotelio capilar tumoral como en las células tumorales [34, 44]. Por otro lado, en un modelo animal, en donde a ratones TA2 se les indujo cáncer de mama, un tratamiento combinado de glibenclamida y cloruro de cobalto ( $CoCl_2$ ) inhibió el crecimiento tumoral y la invasión, de manera similar a los efectos producidos por el paclitaxel, el fármaco de referencia [45].

Pese a que hay muchas evidencias que sugieren una relación de los canales  $K_{ATP}$  en la carcinogénesis, su papel en esta patología aún no está bien establecido.

### **1.3.2 Canales TRPs**

El flujo de  $Ca^{2+}$  hacia el interior de la célula es un proceso clave para la regulación de muchos procesos que son relevantes en la progresión tumoral como lo son la regulación de la proliferación, crecimiento, muerte, adhesión, diferenciación y migración celular. Por lo tanto, prácticamente todos los canales iónicos de  $Ca^{2+}$  se han asociado con alguno de dichos procesos destacando los canales miembros de la familia de los Receptores de Potencial Transitorio (TRP). Los canales TRPs son canales catiónicos no selectivos compuestos por 6 segmentos transmembrana que constituyen una de las familias más numerosas de canales iónicos. De hecho, está formada por más de 28 miembros que se expresan abundantemente tanto en células excitables como no excitables y que tienen diferentes mecanismos de activación, conductancia iónica y funciones fisiológicas. Particularmente en las células no excitables representan la principal vía de entrada de  $Ca^{2+}$ . Los canales TRPs fueron inicialmente identificados en

*Drosophila melanogaster*, en donde una mutación en los genes *trp* y *trpl* suprimió selectivamente la respuesta a los estímulos de la luz y a la depolarización sostenida relacionada con el flujo intracelular de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  en los fotorreceptores. Como consecuencia, la mutante TRP de *Drosophila* mostró una despolarización transitoria en lugar de sostenida en respuesta a la luz y se decidió llamarles a estas proteínas como Receptores de Potencial Transitorio [46-48]. Dichas proteínas se clasifican en 7 subfamilias, de acuerdo a la homología de sus secuencias de aminoácidos [49]: TRPC (canónica), TRPV (vaniloide), TRPM (melastatina), TRPA (anquirina), TRPP (policistina), TRMPL (mucolipina) y TRPN (No mecanoreceptor o Nompc). Diversos estudios han mostrado que los canales TRPs están claramente implicados en el desarrollo y fisiopatología de distintos tipos de cáncer [48, 50, 51].

### 1.3.2.1 TRPC6

La familia de canales TRPC está conformada por 7 miembros, TRPC1-7, los cuales son principalmente permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  y con base a su homología en las secuencias de aminoácidos se dividen en 4 subgrupos: TRPC1, TRPC3/6/7, TRPC4/5 y TRPC, que en humanos es un pseudogen. Particularmente, los canales TRPC6 son activados por diacilglicerol, a través de la activación de 2 tipos de receptores: 1) Receptores Acoplados a Proteínas G (GPCRs) y 2) receptores de cinasas de tirosina [52, 53]. En tejidos normales los canales TRPC6 se expresan prácticamente en todos los tejidos, sin embargo, de manera abundante han sido detectados en placenta, bazo, ovario, cerebro y tejidos ricos en músculo liso como pulmón, estómago, colon, esófago y miometrio. Contribuyen a la regulación de diversos procesos fisiológicos como en la regulación de la filtración glomerular al modular la contracción de las células mesangiales glomerulares y también regulan la contracción de las células vasculares de músculo liso pulmonar por mencionar algunos ejemplos [46, 50, 51, 54, 55]. Los canales TRPC6 pueden formar homotetrámeros o heterotetrámeros con otros miembros de la familia TRPC como con los canales TRPC3 [56].

Los canales TRPC6 se han encontrado sobre expresados en múltiples tipos de cáncer a nivel de líneas celulares y en tejidos de pacientes. Por ejemplo, se ha determinado su expresión en líneas celulares de cáncer de mama [56, 57], así como en cultivos primarios del mismo tipo de cáncer [58]; cáncer gástrico [59]; hepatocarcinoma [60]; carcinoma renal [61]; cáncer de esófago

[62]; glioma [63, 64]; cáncer de próstata [65, 66]; carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello [67] y cáncer de pulmón [68]. En la mayoría de los cánceres antes mencionados, los canales TRPC6 se han visto implicados en la proliferación celular ya que existen evidencias que muestran que su silenciamiento [56, 60-63, 66] o su bloqueo farmacológico con SKF9636, Lantano ( $\text{La}^{3+}$ ) o 2-Aminoetoxidifenil borato (2-APB) [59, 62, 63, 68] reduce la proliferación celular al interferir con la progresión del ciclo celular, ya que induce la fosforilación de Cdc2 [59] o bloquean la activación de CDK1 al inhibir la expresión de Cdc25c [63], en ambos casos, provocando un arresto en la fase G2/M. Por otro lado, en células de cáncer de próstata y en células de glioma se ha demostrado que los efectos de los canales TRPC6 sobre la proliferación involucran la activación de NFAT, y su respectiva translocación al núcleo provoca la expresión de genes necesarios para la proliferación [64, 69].

También se ha demostrado que la expresión de los canales TRPC6 puede ser relevante para otros procesos característicos del cáncer como la invasión ya que en células de carcinoma escamoso de cabeza y cuello, al silenciar el canal con un siRNA se inhibió dramáticamente tanto la migración celular como la invasión, sin alterar la proliferación celular [67]. Los canales TRPC6 también han sido relacionados con la angiogénesis, ya que en células endoteliales, como las HUVEC, la regulación a la baja del canal, disminuye la formación de túbulos inducida por VEGF [70]. Mientras que en las células de glioblastoma, U373MG, el silenciamiento de los canales TRPC6 además de provocar una disminución en la proliferación celular, también disminuyó la migración celular y la angiogénesis [64].

En experimentos *in vivo* también se ha demostrado la importancia de los canales TRPC6 en el desarrollo de diversos tipos de cáncer. Por ejemplo, su inhibición o su inactivación suprime la formación de tumores en ratones desnudos [59, 62, 63]. Asimismo, en muestras de pacientes se ha determinado una sobre expresión de los canales TRPC6 tanto a nivel de mRNA como de proteína en diversos cánceres como el de mama [56-58], esofágico [62, 71], glioma [63], renal [61]; próstata [65], carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello [67], pulmón [68] en comparación con sus respectivos tejidos normales. Particularmente, en el caso del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, el gen *trpc6* además de encontrarse sobreexpresado, se encuentra amplificado [67]. En algunos casos, el incremento en la expresión de los canales TRPC6 correlaciona con el grado histológico [63, 65, 68] y en algunos otros inclusive se ha

demostrado que los pacientes con una alta expresión de los canales TRPC6 tienen una menor sobrevivencia a los 5 años, en comparación con aquellos que tienen una baja expresión de los canales [71].

### **1.3.3 Canales Iónicos en Cáncer Cervicouterino**

Diversos canales iónicos se expresan en células de cáncer cervicouterino y se han relacionado con la regulación de diferentes procesos celulares como el volumen celular y la invasión, sugiriendo que dichas proteínas juegan un papel muy importante para el desarrollo de esta enfermedad. A continuación, se describirá la expresión y el potencial papel de algunos canales iónicos en el cáncer cervicouterino.

#### **1.3.3.1 Canales de cloruro (Cl<sup>-</sup>)**

Los canales de Cl<sup>-</sup> son esenciales para el transporte de sales y agua a través de la membrana en muchas células epiteliales y pueden ser activados por cAMP, Ca<sup>2+</sup> y por el volumen celular [72, 73]. La regulación del volumen celular es un proceso que le permite a la célula mantener su volumen a pesar de los cambios en la osmolaridad extracelular. Las células epiteliales poseen múltiples vías de señalización relacionadas con la regulación del volumen celular. Por ejemplo, durante la progresión del ciclo celular las células tienden a incrementar significativamente su tamaño (especialmente durante la transición G1/S), lo anterior altera el volumen celular por lo que se activa la disminución del volumen regulador (RVD, por sus siglas en inglés) en respuesta a la hipotonicidad [74]. La activación de los canales de Cl<sup>-</sup> en respuesta al estrés hipotónico ha sido demostrada en varias líneas celulares [74-76]. Particularmente, en el cáncer cervicouterino la actividad de canales de Cl<sup>-</sup> activados por volumen ha sido detectada en células HeLa y en células provenientes de LSIL y HSI y se demostró que su activación está asociada con: 1) la transformación maligna del epitelio escamoso cervical, independientemente de la infección por VPH y 2) con la migración celular [77, 78]. Por otro lado, en células SiHa se han detectado canales de cloruro funcionales y su bloqueo farmacológico con tamoxifeno y NPPB (ácido 5-Nitro-2-(3-fenilpropilamino) benzoico) produce un arresto en la fase G0/G1 del ciclo celular, sugiriendo que la actividad del canal es crítica para el control de la progresión del ciclo celular en dichas células [74].

### **1.3.3.2. Receptores purinérgicos**

Existen dos tipos de receptores purinérgicos, receptores P1 cuyo ligando es la adenosina y los receptores P2 que reconocen al ATP, ADP, UTP y UDP. Los receptores A1 a su vez se dividen en 4 subtipos: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> y A<sub>3</sub>, todos acoplados a proteínas G. Mientras que los receptores P2 se dividen en 2 familias, P2X canales activados por ligando (ATP) y permeables a ciertos cationes como K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> y los P2Y, acoplados a proteínas G. Hasta la fecha, 7 tipos de receptores P2X<sub>(1-7)</sub> han sido clonados y caracterizados en mamíferos. Este tipo de canales se expresan tanto en células excitables como no excitables y pueden mediar una variedad de acciones fisiológicas como la contractilidad del músculo liso, la secreción neuroendocrina, la modulación de la transmisión sináptica, la transmisión de la percepción del dolor, y la regulación de las funciones celulares tales como el metabolismo, la síntesis de ADN y la proliferación, la diferenciación y la muerte celular por apoptosis y necrosis [79, 80]. Específicamente en el cérvix, los receptores purinérgicos se relacionan con la regulación de la secreción del moco cervical [81]. Particularmente, los receptores P2X<sub>4</sub> y P2X<sub>7</sub> han sido detectados a nivel de mRNA y proteína en células CaSki. Por otro lado, la activación del receptor P2X<sub>7</sub> media la apoptosis en células cervicales normales donde se expresa abundantemente. Mientras que en células cancerosas se expresa en forma abundante una isoforma P2X<sub>7j</sub>, que es deficiente en la unión con el ligando, en la formación del poro e inducción de apoptosis [82-85].

### **1.3.3.3 Canales de Na<sup>+</sup>**

Los canales de sodio activados por voltaje (Nav) se expresan abundantemente en células excitables en donde son responsables de la iniciación y propagación de los potenciales de acción. También se expresan, en menor proporción, células no excitables en donde su papel fisiológico aún no ha sido establecido, pero se han relacionado con la regulación de algunos procesos celulares como la migración y adhesión [86, 87]. Los Nav se encuentran desregulados en una gran variedad de cánceres, entre los cuales se incluyen los de mama [88, 89], pulmón [90] próstata [91], leucemia, colon [92], ovario [93] y cervicouterino. Particularmente, en el cáncer cervicouterino, se ha demostrado la sobreexpresión de Nav1.2, Nav1.6 y Nav1.7 a nivel de mRNA y proteína en cultivos primarios de CaCu y en biopsias de pacientes con CaCu invasor

con respecto al tejido cervical normal. Interesantemente, en cultivos primarios de CaCu, los canales Nav1.6 al ser bloqueados con toxinas como tetrodotoxina (TTX) y  $\beta$  - toxina de escorpión (Cn2) reducen la invasión [94, 95].

### **1.3.3.4 Canales de K<sup>+</sup>**

#### **1.3.3.4.1 Kv10.1**

Kv10.1 es abundantemente expresado a nivel de mRNA en diversas líneas celulares, en cultivos primarios y en biopsias de pacientes con CaCu y su bloqueo farmacológico (astemizol) disminuye la proliferación e incrementa la apoptosis. Particularmente, la expresión del mRNA se ha encontrado en el 100% de biopsias de pacientes con CaCu mientras que sólo en un 33% de las muestras que fueron utilizadas como control (muestras con un Papanicolaou negativo) se detectó la expresión del mRNA de dicho canal [96, 97]. También se ha estudiado la expresión del Kv10.1 a nivel de proteína mediante inmunocitoquímica/inmunohistoquímica en citologías cervicales de pacientes con lesiones intraepiteliales (alto y bajo grado) y en biopsias de pacientes con neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC 1-3), utilizando citologías de pacientes con Papanicolaou negativos como control. Así mismo, se evaluó la regulación de su expresión por algunos factores de riesgo del CaCu como estrógenos y VPH. La expresión del Kv10.1 fue encontrada en el 67% de las citologías cervicales de lesiones intraepiteliales bajo grado y en un 92% de las muestras provenientes de lesiones intraepiteliales de alto grado. Mientras que sólo en un 27% de las muestras de las citologías normales expresaron el canal Kv10.1. Con lo que respecta a las biopsias de las pacientes con NICs, se encontró que cuanto mayor sea el grado de la lesión, más amplia será la distribución de la proteína del canal. Además, casi el 50% de las pacientes del grupo control que tomaron estrógenos mostraron una expresión del canal. Los resultados anteriores sugieren que el Kv10.1 es un potencial marcador de displasias cervicales y un indicador de riesgo para el desarrollo de lesiones cervicales en pacientes que toman estrógenos [98]. Por otro lado, también se ha evaluado la expresión del canal en células de queratinocitos que tienen transfectados oncogenes del VPH como E6, E7 y E6/E7, donde se observó una sobre expresión del canal a nivel de mRNA en comparación con células de queratinocitos normales [99].

#### **1.3.3.4.2 Canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje de gran conductancia**

Se han descrito una gran variedad de canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup>, pero se agrupan principalmente en 3 clases con base a sus diferencias en cuanto a la conductancia, a su dependencia al voltaje para la apertura del canal y su sensibilidad a los bloqueadores: 1) Canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> de gran conductancia (BK), requieren típicamente concentraciones micromolares de calcio para su activación (; 2) Canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> de conductancia pequeña (SK), son generalmente más sensibles al calcio en los potenciales de membrana negativos, pero su sensibilidad al calcio es independiente del potencial de membrana y 3) Canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> de conductancia intermedia (IK) son un grupo vagamente definido debido a que se incluyen a los canales que no encaja en cualquiera de los otros dos grupos [100]. Los canales BK están ampliamente distribuidos entre las células excitables y no excitables regulando una gran cantidad de funciones como el disparo neuronal [101, 102], secreción endócrina [103], tono muscular [104], osmoregulación [105] , proliferación celular y migración [106]. Se ha demostrado la expresión de los canales BK en células HeLa en donde, además, su bloqueo con iberiotoxina (Ibtx) inhibió la proliferación celular, de manera dependiente a la concentración, al arrestar a las células en la fase G1 y mediante la inducción de apoptosis. Dichos efectos se relacionan con un incremento en la expresión de p53 y una disminución de su proteína chaperona (proteína de choque térmico) [107].

#### **1.3.3.5 TRPC6**

Se ha identificado la presencia a nivel de proteínas de los canales TRPC6 en muestras de pacientes con CaCu. La expresión elevada detectada fue significativamente asociada con la invasión en el espacio linfovascular, lo cual sugiere que el incremento en la expresión de TRPC6 pudiera asociarse con un fenotipo agresivo del CaCu [108].

## **2. JUSTIFICACIÓN**

El cáncer es una enfermedad que actualmente produce los índices más altos de mortalidad y se considera un grave problema de salud pública a nivel mundial. Particularmente, el Cáncer Cervicouterino (CaCu) en nuestro país, representa la segunda causa de muerte por cáncer, en mujeres. Hasta la fecha, existe una gran proporción de pacientes que no responden a la terapia

convencional para el cáncer, teniendo así, un pronóstico muy pobre de vida. Por lo tanto, es esencial investigar nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento del CaCu y los canales iónicos son una alternativa muy prometedora para el desarrollo de nuevas y efectivas terapias contra el cáncer. Los canales iónicos son proteínas que están involucrados en la regulación de un sin número de funciones como el control del volumen celular y la proliferación, contribuyendo así, a mantener la homeostasis celular. En años recientes se ha demostrado que en las células cancerosas existe una alteración en la expresión y en la actividad de diversos canales iónicos con respecto a las células sanas. Se ha propuesto, además, que dichos cambios pueden estar involucrados en el desarrollo del cáncer. Existen muchos fármacos comerciales que funcionan como moduladores (activadores o bloqueadores) de la actividad de muchos canales iónicos. Por lo anterior, los resultados de este estudio, particularmente, sobre las alteraciones en la expresión de algunos canales iónicos, propuestos en el proyecto, en las células de cáncer cervicouterino, así como el papel de dichos canales iónicos en aspectos claves de la carcinogénesis como la proliferación y apoptosis celular, pueden proveer de evidencias para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para combatir al CaCu.

### **3. HIPÓTESIS**

Existe una diferencia en la expresión de canales iónicos en células de cáncer cervical con respecto a las células de cérvix sano. La inhibición de la actividad de aquellos canales iónicos que estén sobreexpresados disminuirá la proliferación celular *in vitro*.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la expresión de canales de potasio y calcio en líneas celulares de cáncer cervical, muestras de tejido de pacientes con cáncer cervicouterino y en cultivos primarios, así como evaluar el efecto de inhibidores de algunos de éstos canales sobre la proliferación y apoptosis en células de cáncer cervicouterino.

## **4.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar la expresión a nivel de mRNA de los canales  $Ca_v3.1$ ,  $Ca_v3.2$ ,  $K_{Ca3.1}$ ,  $K_v1.1$ ,  $K_v3.4$ ,  $K_v8.2$ ,  $K_v11.1$ ,  $Kir6.2$ ,  $TRPM8$ ,  $TRPC6$  y  $TRPV6$  en las líneas celulares C33A, INBL, HeLa, CaSki, SiHa, en muestras de tejido de pacientes con cáncer cervicouterino y en cultivos primarios mediante PCR en tiempo real.
- Evaluar la expresión de los canales iónicos a nivel de proteína mediante inmunohistoquímica/inmunocitoquímica de aquellos que mostraron una expresión diferencial con respecto al cérvix sano a nivel de mensajero.
- Probar el efecto de algunos bloqueadores (de aquellos canales iónicos que se encuentren incrementados a nivel de proteína) sobre la proliferación celular y la apoptosis en las líneas celulares y en los cultivos primarios mediante ensayos de actividad metabólica y experimentos por citometría de flujo, respectivamente.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Líneas celulares**

Las líneas celulares de cáncer cervical HeLa, SiHa, CaSki, INBL, y C-33A, se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas), así como los queratinocitos normales y cultivados de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Dos cultivos primarios de CaCu habían sido previamente establecidos en el laboratorio y caracterizados de acuerdo a su expresión de citoqueratinas y del gen E7 del VPH-16 para confirmar su naturaleza epitelial y cancerosa [96].

#### **5.1.1 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), después las laminillas se incubaron en presencia del anticuerpo específico usado, para el  $TRPC6$  (1:400) o para el  $Kir6.2$  (1:100), durante 2 horas. Los anticuerpos usados fueron obtenidos de Novus International (Littleton CO, USA). Posteriormente, 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) y fueron observadas en el microscopio Olympus IX51; las imágenes se obtuvieron con una cámara DP70 Olympus.

### **5.1.2 Actividad metabólica (ensayo MTT)**

La proliferación celular se estudió por medio del método MTT (bromuro de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] 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. Después de 24 h de incubación, las células fueron expuestas a medio fresco y a diferentes concentraciones de Glibenclamida (Sigma-Aldrich, G0639-5G), así como a diferentes tiempos de incubación. 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 contador de placas, Multiskan FC (Thermo Scientific).

### **5.1.3 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, éstas pueden unir también anexina por lo que para distinguirlas 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. Las células se sembraron en cajas de cultivo de 60 mm y se incubaron durante 48 horas con el medio de cultivo solo o en presencia de glibenclamida (100  $\mu\text{mol/L}$  y 150  $\mu\text{mol/L}$ ) o vehículo (agua estéril). La camptotecina (inductor de apoptosis) y el 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)]. 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.

## **5.2 Muestras de Pacientes**

### **5.2.1 Consideraciones éticas**

Muestras de tejido de cáncer cervicouterino (n = 60) fueron obtenidas de pacientes que asistían a consulta por primera vez al “Instituto Nacional de Cancerología” (INCan) mediante la aprobación del protocolo (013/024/GII) (CEI/846) por el Comité de Ética en Investigación y por el Comité de Investigación. Además, se obtuvo el consentimiento informado de cada una de las pacientes que donaron su tejido. Mientras que el tejido cervical no canceroso (n = 10) fue obtenido de pacientes que se sometieron a una histerectomía indicada por una patología ginecológica benigna en el “Hospital General Manuel Gea González” bajo el siguiente protocolo aprobado (11-84-2013) por el Comité de Ética de dicho hospital.

### **5.2.2 Muestras biológicas**

Las muestras de cáncer cervicouterino utilizadas provenían de pacientes que habían asistido por primera vez al servicio de Ginecología del INCan y que no se habían sometido a ningún tipo de tratamiento contra el cáncer (cirugía, radioterapia y/o quimioterapia). Inmediatamente después de tomada la muestra, para el estudio de expresión del mRNA, ésta fue colectada en un tubo con Trizol y colocada en un contenedor con nitrógeno líquido para su transporte al laboratorio donde fue almacenada a -70 °C hasta su procesamiento. Mientras que para analizar la expresión a nivel de proteína por inmunohistoquímica, inmediatamente después de ser tomada la muestra fue puesta en formaldehído para su fijación. Las muestras tomadas, fueron analizadas histológicamente y clasificadas de acuerdo a la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) en Adenocarcinoma (AC) y Carcinoma Epidermoide o de

células escamosas (SCC). Se analizaron 30 biopsias para los estudios de expresión génica y otras 30 biopsias más para los estudios de expresión de proteína.

### **5.2.3 Inmunohistoquímica**

Las biopsias de tejido cervical sano y cancerosos fueron fijadas en formaldehído, se embebieron en parafina y se realizaron cortes de 5  $\mu\text{m}$  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 citratos (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); después, las laminillas se incubaron en presencia del anticuerpo primario correspondiente anti-Kir6.2 (1:100) (Novus Biologicals, NBP1-00900); anti-SUR1 (1:50) (Novus Biologicals, NBP1-59778); anti-SUR2 (1:300) (Novus Biologicals, NBP1-84436); anti-TRPC6 (1:400) (Novus Biologicals, NBP1-77260) por 2 horas a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El resto del proceso fue igual que el utilizado en la inmunocitoquímica, arriba descrita.

## **5.3 Estudios de Expresión Génica**

### **5.3.1 Extracción de RNA**

Para las líneas celulares y los cultivos primarios seguimos la metodología basada en el método descrito por Chomczynski y Sacchi [109]. El primer paso consistió en eliminar el medio de cultivo por aspiración. Después se le adicionó 1 mL de trizol (Invitrogen, No. Cat. 15596-018) frío y se rasparon las células adheridas a las paredes de la caja, usando los raspadores. Posteriormente, la muestra se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL, se homogeneizó y se le adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo (Sigma-Aldrich C-2432-500 ml) frío. Después, la muestra fue centrifugada a una velocidad de 12,000 rpm, durante 20 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se transfirió la fase acuosa (superior transparente) a un tubo nuevo (sin tocar la interfase para impedir que haya contaminación por DNA genómico). Luego, se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol (Sigma-Aldrich 1-9516-500ML) frío para precipitar el RNA. La muestra se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  toda la tarde. Al otro día, la muestra se centrifugó a 12,000 rpm, durante 20 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Después, se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1mL de etanol (Sigma- Aldrich E7148-500ML) frío al 75%. La muestra fue nuevamente centrifugada a las mismas condiciones durante 20 min,

se decantó rápidamente y se eliminó el exceso de etanol con una gasa estéril. Por último, la pastilla se resuspendió en un volumen de 20 a 50  $\mu\text{L}$ , dependiendo de su tamaño, de agua estéril y se almacenó a  $-70^\circ\text{C}$  hasta su utilización. Para el caso de las biopsias colectadas, estas fueron pulverizadas en morteros enfriados con nitrógeno líquido, para evitar la degradación del RNA. Posteriormente, la muestra pulverizada fue colectada y transferida al mismo tubo con trizol donde fue colectada. Los pasos posteriores fueron los mismos que se siguieron para el caso de las células en cultivo.

### **5.3.2 Purificación del RNA con DNasa**

El objetivo de este paso es remover el DNA genómico de las preparaciones de RNA previo a las reacciones de RT-PCR. El primer paso fue elaborar una mezcla de reactivos que contenía RNA, agua y DNasa (Roche No. Cat. 776785). La mezcla anterior se agitó por algunos segundos con vórtex. Posteriormente, se colocaron los tubos dentro del termociclador y se sometieron al siguiente programa de temperaturas: 1)  $37^\circ\text{C}$  por 60:00 min 2)  $75^\circ\text{C}$  por 5:00 min 3)  $4^\circ\text{C}$  por 60:00 min. El producto de la reacción se almacenó a  $-70^\circ\text{C}$ . En cada corrida, además de las muestras de interés, se incluyó una muestra para el control interno de calidad, la cual fue el blanco de reactivos. El blanco de reactivos sirve para detectar cualquier contaminación procedente de los reactivos, contiene todos los reactivos excepto la muestra, en su lugar se utilizó agua.

### **5.3.3 Obtención del cDNA**

Se elaboró la siguiente mezcla de reactivos: Mix 1 (RNA, Oligo DT (Invitrogen, No. Cat., 18418-012), DNTP Mix (New England Biolabs, No. Cat., N0446S) y agua) y el Mix 2 (MMuLV (New England Biolabs No. Cat., M0253S), agua y RNasa Out (Invitrogen No. Cat., 10777-019)). En tubos de 0.2 mL previamente identificados, se depositaron los reactivos del mix 1. Posteriormente, en el termociclador las muestras se sometieron al siguiente programa de temperaturas: 1)  $65^\circ\text{C}$  por 5:00 min 2)  $37^\circ\text{C}$  por 50:00 min 3)  $70^\circ\text{C}$  por 15:00 4)  $4^\circ\text{C}$  por infinito. Durante el paso número 2 se agregó el mix 2. Por último, las muestras se almacenaron a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su utilización. En cada corrida, además de las muestras de interés, se incluyeron muestras para el control interno de calidad tales como controles negativos y blancos de reactivos.

El blanco de reactivos es la misma muestra obtenida del tratamiento con DNAsa. En tanto que el control negativo, no contiene transcriptasa reversa y nos sirve para detectar contaminación por DNA genómico procedente de la muestra

#### **5.3.4 PCR en tiempo real empleando sondas Taqman**

El primer paso fue elaborar las siguientes mezclas de reactivos: Taqman Universal PCR master mix (Applied Biosystems, 4304437), sonda específica para cada gen analizado, cDNA y agua. Se incluyeron en cada corrida muestras para el control interno de calidad tales como controles positivos, negativos de la RT (sin reverso transcriptasa) y blancos de reactivos la DNAsa y la RT, así como NTC de la PCR tiempo real. En tubos de 0.5 ml, se preparó la cantidad de mix de acuerdo al número de muestras que se quieran analizar. Posteriormente, las muestras se sometieron al programa de temperaturas que se describe a continuación: 1) 95 °C por 10 min (para activar a la enzima) 2) 95 °C por 10 s (separación de la doble cadena del DNA) y 3) 60 °C por 1 min (alineamiento y elongación del primer). Las últimas 2 etapas se repitieron por 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  $\Delta$  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 con valor de  $p < 0.05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Determinar la expresión a nivel de mRNA de los canales iónicos a estudiar

- **Líneas celulares y cultivos primarios.** Se evaluó la expresión de diversos canales iónicos en una línea celular de queratinocitos normales, los cuáles fueron utilizados como control y en cada una de las líneas de cáncer cervicouterino y en los cultivos primarios. Con esta primera prueba descartamos aquellos canales iónicos cuya expresión génica no fue detectada mediante PCR-tiempo real o que no presentó algún cambio con respecto al control. Por lo anterior, sólo nos enfocamos al estudio de los siguientes canales iónicos: Ca<sub>v</sub>3.1, Ca<sub>v</sub>3.2, Kv11.1, Kir6.2, y TRPC6 en las diferentes líneas celulares de cáncer cervicouterino y en dos cultivos primarios previamente establecidos en el laboratorio, nombrados como CP1 y CP2, respectivamente. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla (Tabla 5):

Tabla 5. **Patrón de expresión de los canales iónicos Ca<sub>v</sub>3.1, Ca<sub>v</sub>3.2, Kv11.1, Kir6.2, y TRPC6 en diferentes líneas celulares y cultivos primarios de CaCu.** El signo (+) indica un incremento en la expresión del mRNA estadísticamente significativa con respecto al control. Mientras que el signo (-) indica una disminución de la expresión del mRNA estadísticamente significativa con respecto al control. Los resultados fueron obtenidos con el programa GraphPad Prism versión 5.0. el análisis empleado fue un ANOVA de una vía, seguida de una prueba de Tukey para comparar los datos entre los diferentes grupos experimentales; valores de P < 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos. El signo = significa que no hubo cambio alguno en los patrones de expresión del mRNA. Mientras que los espacios en blanco reflejan la ausencia del mRNA.

Células	Cav3.1	Cav3.2	Kir6.2	Kv11.1	TRPC6
CP1	+		-	+	+
CP2	+		-	=	=
CaSki	+		=	-	
C33A	+		+	+	
HeLa	+	+	+	+	
INBL	+		-	+	
SiHa	+		-	+	

- **Muestras de pacientes.** Se evaluó la expresión de diversos canales iónicos en 30 muestras de pacientes con diagnóstico de cáncer cervicouterino y en 10 muestras de cérvix no canceroso, las cuáles fueron utilizadas como control. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla (Tabla 6):

Tabla 6. **Patrón de expresión de los canales Cav3.1, Cav3.2, Kv11.1, Kir6.2, y TRPC6 en muestras de pacientes con CaCu.** El signo (+) indica un incremento en la expresión del mensajero con respecto al control. Mientras que el signo (-) indica una disminución del mensajero con respecto al control. Los espacios en blanco reflejan la ausencia del mRNA.

	<b>Cav3.1</b>	<b>Cav3.2</b>	<b>Kir6.2</b>	<b>Kv11.1</b>	<b>TRPC6</b>
<b>Biopsias ( n = 30)</b>	-	+	+		-

De manera general, los resultados muestran una gran variabilidad entre el patrón de expresión génica de los canales iónicos estudiados entre las líneas celulares y las muestras de pacientes. Con lo que respecta al canal TRPC6 la expresión del mRNA sólo fue detectada en 20 de las 30 muestras analizadas, mostrando en la mayoría de los casos (excepto en uno) una disminución del mRNA comparada con el grupo control. Por otro lado, en todas las muestras analizadas se detectó el mRNA de Kir6.2, encontrándose en un gran porcentaje de las muestras un incremento en la expresión del mensajero con respecto al grupo control. En ambos casos los resultados obtenidos de la expresión génica en las pacientes correlacionan con los datos obtenidos en las líneas celulares. Por lo anterior, sólo nos enfocamos a efectuar los experimentos de expresión de proteína en los canales Kir6.2 y TRPC6. Por lo anterior, el resto de los resultados se enfocarán a estos dos canales.

## 6.2 Canales Kir6.2

### 6.2.1 Expresión diferencial de los canales Kir6.2 en las líneas celulares de cáncer cervicouterino

Primero se examinó la expresión de los canales  $K_{ATP}$  en los dos cultivos primarios (PC1 y PC2) y en cinco líneas celulares humanas de cáncer cervical (C33A, CaSki, HeLa, INBL y SiHa). El mRNA de la subunidad Kir6.2 fue estudiado por RT-PCR en tiempo real y normalizado con

respecto al patrón de expresión de los queratinocitos primarios normales. La expresión de la subunidad Kir6.2 fue detectada en todas las líneas celulares (Fig. 1A). Sin embargo, en comparación con los queratinocitos normales, la única diferencia estadísticamente significativa fue la sobreexpresión observada en las células HeLa. Por lo anterior, sólo nos enfocamos en analizar la expresión a nivel de proteína de la subunidad Kir6.2 en células HeLa. En la figura 1B se muestra la expresión a nivel de proteína de las subunidades Kir6.2 y SUR2 de los canales  $K_{ATP}$  (inmunotinción café). Tejidos de corteza cerebral humana y de testículos de rata fueron usados como controles positivos para la expresión de las proteínas de Kir6.2 y SUR respectivamente (Fig. complementaria 1). La proteína SUR1 no pudo ser detectada. A pesar de la débil señal observada en la inmunotinción para la subunidad SUR2, nuestros resultados sugieren fuertemente que las células HeLa expresan los canales  $K_{ATP}$  compuestos por las subunidades Kir6.2 y SUR2.

### **6.2.2 La glibenclamida disminuye la proliferación de las células HeLa y de los queratinocitos normales**

Nos preguntamos si la expresión de los canales  $K_{ATP}$  en las células HeLa pudiera estar relacionada con la proliferación celular. Por lo tanto, examinamos el efecto de la glibenclamida (un bloqueador de los canales  $K_{ATP}$ ) sobre la proliferación celular de las células HeLa mediante el ensayo de actividad metabólica basado en el MTT. La incubación de las células HeLa con diferentes concentraciones de glibenclamida (40-200  $\mu$ M) durante 48 h provocó una disminución de la viabilidad celular de aproximadamente el 60%, la cual fue dependiente de la concentración y del tiempo de exposición (Figs. 1C-D). En contraste, la glibenclamida disminuyó la proliferación celular de los queratinocitos normales sólo en un 30% (Fig. 1D).

Además, estudiamos el efecto de la glibenclamida en otras líneas celulares que mostraron niveles variables de expresión del mRNA de la subunidad Kir6.2. Interesantemente, observamos que a medida que los niveles de expresión del mRNA de Kir6.2 incrementaban, el efecto inhibitorio de la glibenclamida, también incrementaba (Fig. 1E). Por otro lado, la apoptosis no fue afectada por el tratamiento con glibenclamida (Fig. complementaria 1). Lo siguiente que hicimos, fue estudiar la expresión de los canales  $K_{ATP}$  a nivel de mRNA y de proteína en muestras de tejidos humanos cervicales cancerosos y no-cancerosos.

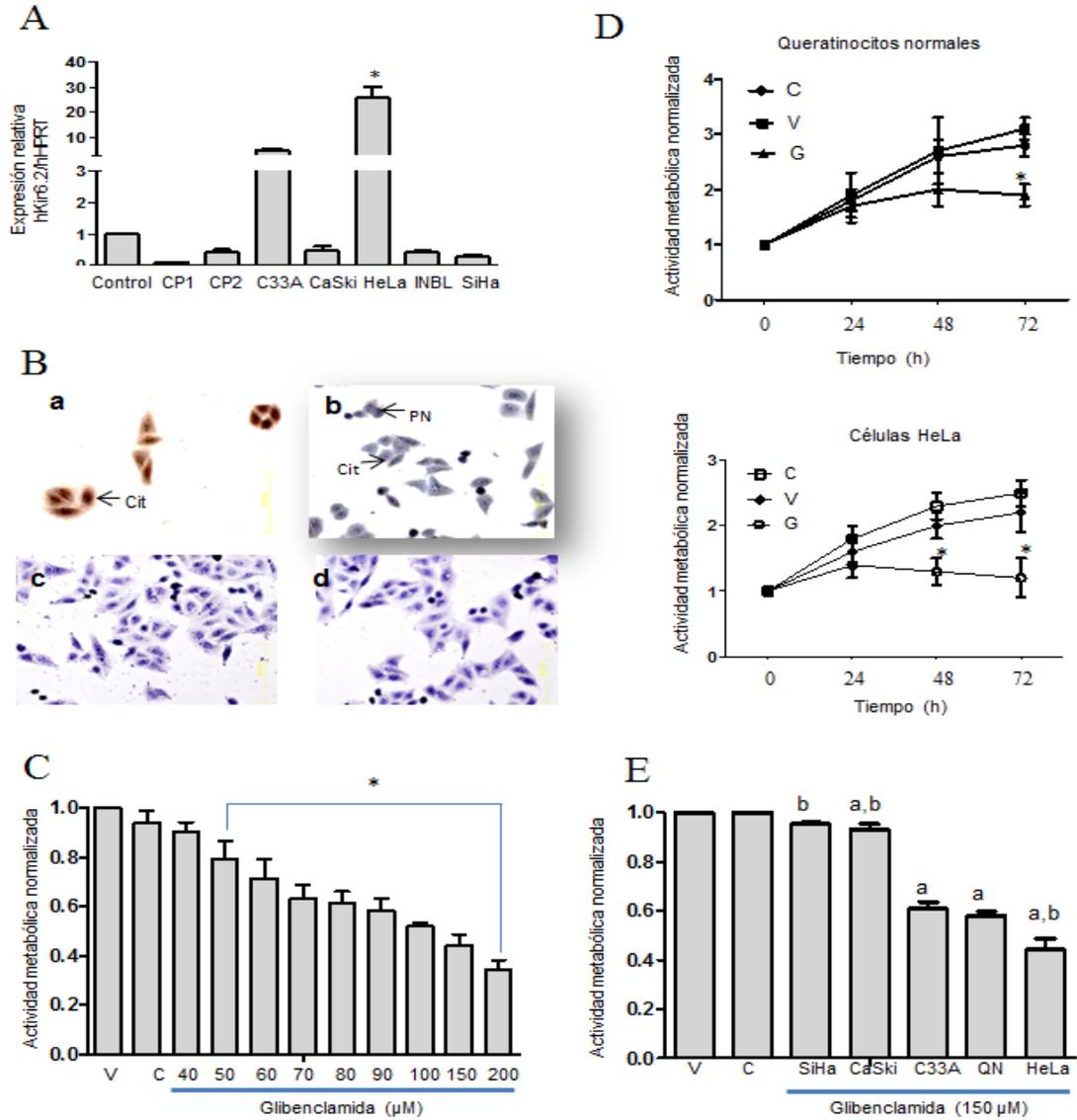
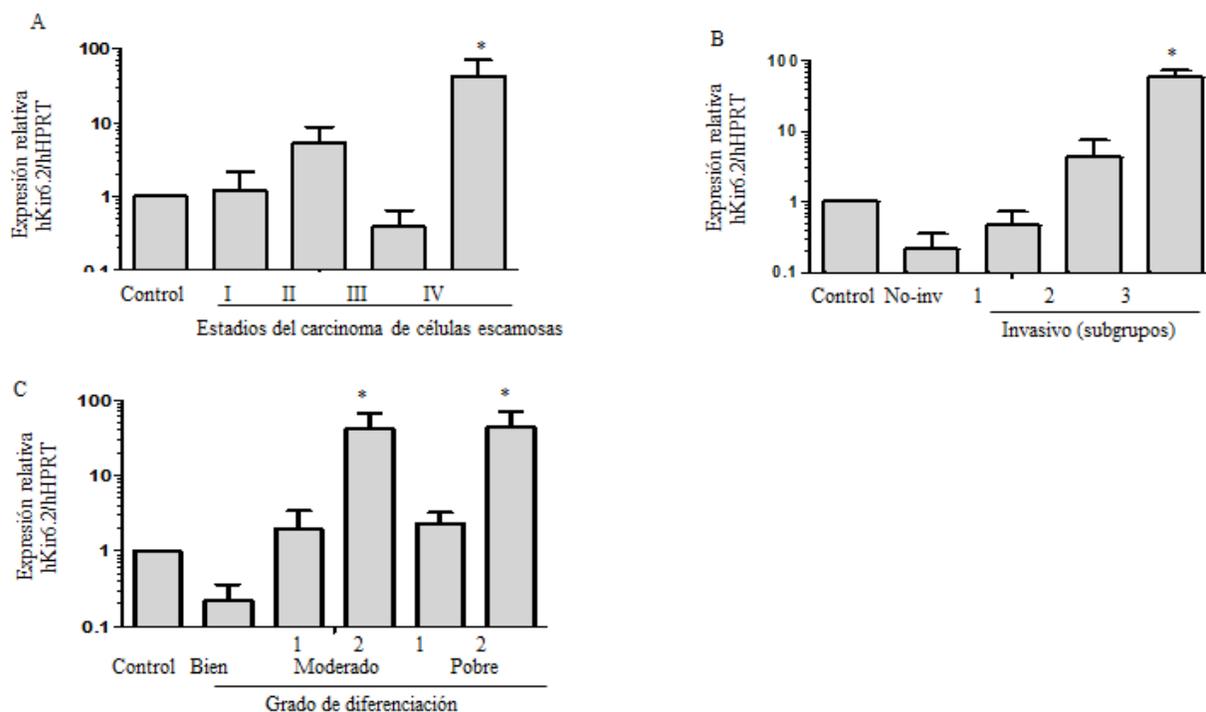


Figura 1. **Expresión de los canales  $K_{ATP}$  en células de cáncer cervicouterino.** **A.** La expresión relativa de mRNA de la subunidad Kir6.2 en queratinocitos normales (Control), cultivos primarios (CP1 y CP2) y líneas celulares de cáncer de cuello uterino se determinó mediante RT-PCR en tiempo real. Se efectuaron tres réplicas experimentales. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE (Desviación estándar), \*  $P < 0.05$  vs. control. **B.** La expresión a nivel de proteína de las subunidades de los canales  $K_{ATP}$  en las células HeLa se determinó por inmunocytoquímica. Una tinción café en las células HeLa revela la presencia de las subunidades Kir6.2 (a) y SUR2 (b). La expresión de las proteínas de la subunidad Kir6.2 se localizó predominantemente en el citoplasma de la célula (Cit) mientras que la expresión SUR2 fue apenas detectable en el espacio perinuclear (PN) de las células HeLa (escala = 62.7  $\mu$ m). Aumento original 200 X. Control negativo. No se observó inmunotinción en ausencia del anticuerpo primario (c-d). Después de 48 h de tratamiento la viabilidad de las células HeLa disminuyó de forma dependiente de la concentración C y del tiempo a la concentracipin de 150  $\mu$ M. El efecto inhibitorio fue más pronunciado en las células HeLa comparadas con los queratinocitos normales **D.** Las células fueron cultivadas sólo en medio (C), con agua estéril como vehículo (V) o glibenclamida (G). \*  $P < 0.05$  vs. vehículo. Los datos se presentan como la media + DE de tres experimentos independientes. El efecto de la glibenclamida (150  $\mu$ M, 48 h) fue más pronunciado en las líneas celulares que mostraron una expresión más alta del mRNA de Kir6.2 **E.** Los datos son la media  $\pm$  DE (n = 3).  $P < 0.05$  vs. Vehículo (<sup>a</sup>) o queratinocitos normales (<sup>b</sup>). QN = queratinocitos normales.

### **6.2.3 Expresión del mRNA de Kir6.2 en biopsias humanas y su potencial asociación con la diferenciación tumoral y la invasión**

Estudiamos la expresión a nivel de mRNA de la subunidad Kir6.2 en 24 muestras de tejido canceroso (22 de carcinoma celular escamoso y 2 de adenocarcinoma). Las muestras fueron clasificadas de acuerdo a la FIGO como estadio I (cuatro muestras del estadio IA y dos muestras del estadio IB); II (una muestra del estadio IIA y cinco muestras del estadio IIB); III (siete muestras del estadio IIIB); IV (tres muestras del estadio IIIB); una muestra de adenocarcinoma *in situ* y una muestra de adenocarcinoma invasor. La expresión del mRNA fue normalizada con respecto a 1, como resultado de los valores obtenidos de 10 biopsias de pacientes con un cérvix no canceroso que fueron usadas como controles. La expresión más alta fue detectada en las biopsias del estadio clínico IV del carcinoma celular escamoso (Fig. 2A) y algunas de estas muestras mostraron niveles de mRNA de Kir6.2 por arriba de 60 veces más que los controles. Observamos una diferencia en la expresión del mRNA del Kir6.2 en tumores invasivos con respecto a los no invasivos. Con base a esa diferencia detectada, separamos las muestras de tumores invasivos en tres grupos de acuerdo a sus niveles de expresión del mRNA. Algunos tumores invasivos mostraron una expresión hasta de 50 veces más del mRNA en comparación con los tumores no invasivos o con las biopsias de cérvix no canceroso (Fig. 2B). Consideramos como tumores no invasivos aquellos cuyo componente invasor fue delimitado a focos microscópicos de unas pocas micras en longitud y profundidad, como se observó en las biopsias de carcinoma *in situ* (tumores microinvasivos, cuatro muestras del estadio IAI y una muestra de adenocarcinoma *in situ*). Las muestras también fueron divididas en referencia a su grado de diferenciación en bien, moderadamente y pobremente diferenciadas. Una vez más, formamos subgrupos. La más alta expresión fue observada en muestras de pacientes clasificadas con grados de diferenciación moderadamente y pobremente diferenciados (Fig. 2C) y algunas de estas biopsias mostraron niveles por arriba de 50 veces más mRNA de Kir6.2 con respecto a los controles. Además, analizamos la posible asociación entre la expresión del mRNA de Kir6.2 y la invasión en el espacio linfovascular. Siete muestras reportaron tener permeación linfovascular y el 100% de estas muestras mostraron altos niveles de expresión del mRNA de Kir6.2. Sin embargo, 13 de las 23 (56.6%) muestras que no tenían permeación linfovascular también

mostraron una alta expresión del mRNA de Kir6.2, así que no encontramos una asociación entre estos parámetros.



**Figura 2. Expresión del mRNA de la subunidad Kir6.2 en biopsias de cáncer cervicouterino. A.** Expresión relativa del mRNA de la subunidad Kir6.2 en tejidos de cáncer cervicouterino de pacientes, las cuáles fueron agrupadas en los diferentes estadios clínicos del carcinoma epidermoide desde el estadio I hasta el estadio IV. Todos los datos fueron normalizados al promedio de la expresión del mRNA de la subunidad Kir6.2 en 10 tejidos de cérvix no canceroso (control). Las muestras del estadio IV son las que mostraron la más alta expresión del mRNA de Kir6.2. Los datos son presentados como el promedio  $\pm$  DE. Estadio I (n=6), estadio II (n=6), estadio III (n=7) y estadio IV (n=3). \* P < 0.05 vs. Control. **B.** Expresión relativa del mRNA de la subunidad Kir6.2 en tejidos de cáncer cervicouterino de pacientes, las cuales fueron agrupadas de acuerdo al tipo de carcinoma que presentaban, en carcinoma no invasor (No-inv) y carcinoma invasor, el cual, a su vez, fue subclassificado en tres grupos de acuerdo a su patrón de expresión (I1-I3). Todos los datos se normalizaron a la expresión Kir6.2 en 10 muestras de tejidos del cuello uterino no cancerosas. Los datos son la media  $\pm$  no invasor (n=5); 1 (n=7); 2 (n=12) y 3 (n=4). P < 0,05 vs. cada grupo (\*). **C.** Expresión relativa del mRNA de la subunidad Kir6.2 en tejidos de cáncer de cuello uterino de las pacientes que se agruparon de acuerdo a su grado histopatológico de diferenciación en bien, moderado y pobre. Los grupos de moderado y pobre fueron, también, subclassificados en 2 grupos por su patrón de expresión relativa, respectivamente. Todos los datos se normalizaron a la expresión Kir6.2 en 10 muestras de tejidos del cuello uterino no cancerosas. Los datos son la media  $\pm$  DE. bien (n = 4); moderado 1 (n = 13); moderado 2 (n = 3), pobre 1 (n = 4) y pobre 2 (n = 3). P < 0,05 vs. cada grupo (\*).

#### 6.2.4 Expresión de los canales $K_{ATP}$ en tejidos humanos cervicales

Determinamos la expresión a nivel de proteína de las subunidades Kir6.2 y SUR2 de los canales  $K_{ATP}$  en 30 biopsias de tejido cervical canceroso (24 carcinoma escamoso y 6

adenocarcinomas) mediante inmunohistoquímica y en 10 biopsias de tejido cervical no canceroso. Las biopsias de tejido cancerosos fueron obtenidas de pacientes diferentes de aquellas que participaron en el estudio de expresión génica. No se observó inmunotinción en la mayoría de los tejidos cervicales no cancerosos (9/10) (Fig. 3A), de hecho, solamente una muestra mostró una señal débil. En concordancia, no fue observada expresión de la proteína de SUR2 (10/10) en los tejidos cervicales no cancerosos (Fig. 3B). En contraste, diez de las treinta muestras de cáncer cervical mostraron una intensa tinción, que indica una abundante expresión de la proteína de la subunidad Kir6.2 (Fig. 3A). Las muestras positivas para la inmunotinción correspondían al estadio I (una muestra del estadio IA y una muestra del estadio IB); estadio II (dos muestras del estadio IIB); estadio III (dos muestras del estadio IIIB); estadio IV (una muestra del estadio IVA y tres del estadio IVB) y un adenocarcinoma del estadio IB, de acuerdo a la clasificación de la FIGO. Las células estromales de los tejidos tumorales también mostraron una ligera tinción para la subunidad Kir6.2. La expresión de la subunidad SUR2 fue detectada solamente en 4 tejidos cancerosos (Fig. 3B). Dos muestras es los estudios de inmunohistoquímica provenían de pacientes con permeación linfovascular, ambas muestras mostraron altos niveles de la proteína de la subunidad Kir6.2.

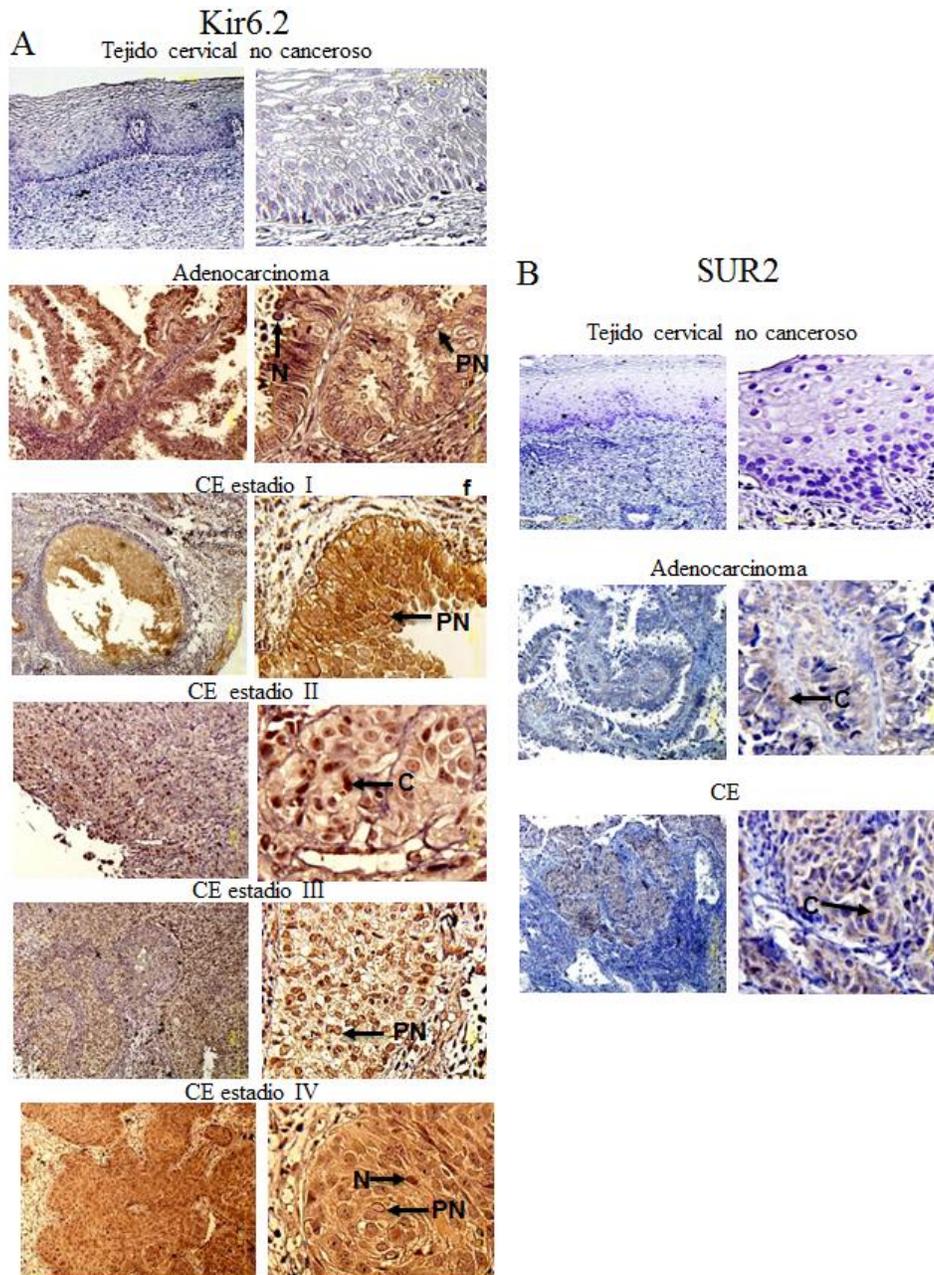


Figura 3. **Sobreexpresión de los canales  $K_{ATP}$  en tejidos cervicales cancerosos.** **A.** Inmunohistoquímica de secciones seriales representativas de muestras quirúrgicas de tejido cervical no canceroso, de tejido de cérvix canceroso de adenocarcinoma y de carcinoma epidermoide desde los estadios clínicos I hasta el IV. Una tinción café es positiva para la presencia de la subunidad Kir6.2 a las ampliaciones de 100 (escala = 251  $\mu$ m) y 400 (escala = 62.7  $\mu$ m). La subunidad Kir6.2 fue predominantemente localizada en el núcleo celular (N) y en el espacio perinuclear (PN). Una tinción negativa fue observada en el tejido cervical no canceroso. **B.** Inmunohistoquímica de secciones seriales representativas de muestras quirúrgicas de tejido cervical no canceroso, de tejido de cérvix canceroso de adenocarcinoma y de carcinoma epidermoide. Una tinción café es positiva para la presencia de la subunidad SUR2 a las ampliaciones de 100 y 400. La subunidad SUR2 fue predominantemente localizada en el citoplasma (C) y una tinción negativa fue observada en el tejido cervical no canceroso. La expresión de los canales  $K_{ATP}$  estuvo marcadamente incrementada en los tejidos de cérvix canceroso con respecto a los tejidos de cérvix no canceroso.

## 6.3 Canales TRPC6

### 6.3.1 Expresión de los canales TRPC6 en las líneas celulares de cáncer cervicouterino

Hasta la fecha, no existen datos disponibles de la expresión de los canales TRPC6 en líneas celulares humanas de cáncer cervicouterino. Realizamos los mismos experimentos de expresión génica mediante RT-PCR en tiempo real en los dos cultivos primarios (PC1 y PC2) y en cinco líneas celulares humanas de cáncer cervical (C33A, CaSki, HeLa, INBL y SiHa). El nivel de expresión del mRNA de dichos canales fue normalizado con respecto al patrón de expresión de los queratinocitos primarios normales. La Fig. 4A muestra el patrón de expresión del mRNA de los canales TRPC6 *in vitro*, observando que en el PC1 el mRNA se encuentra sobreexpresado, mientras que, en el otro cultivo primario, el PC2, se encuentra disminuido, además de que el mRNA de los canales TRPC6 fue indetectable en las cinco líneas celulares probadas. Por lo tanto, solamente determinamos la expresión a nivel de proteína de los canales TRPC6 en los cultivos primarios, obteniendo resultados que correlacionan con los vistos en los experimentos de RT-PCR en tiempo real, como se muestra en la Fig. 4B.

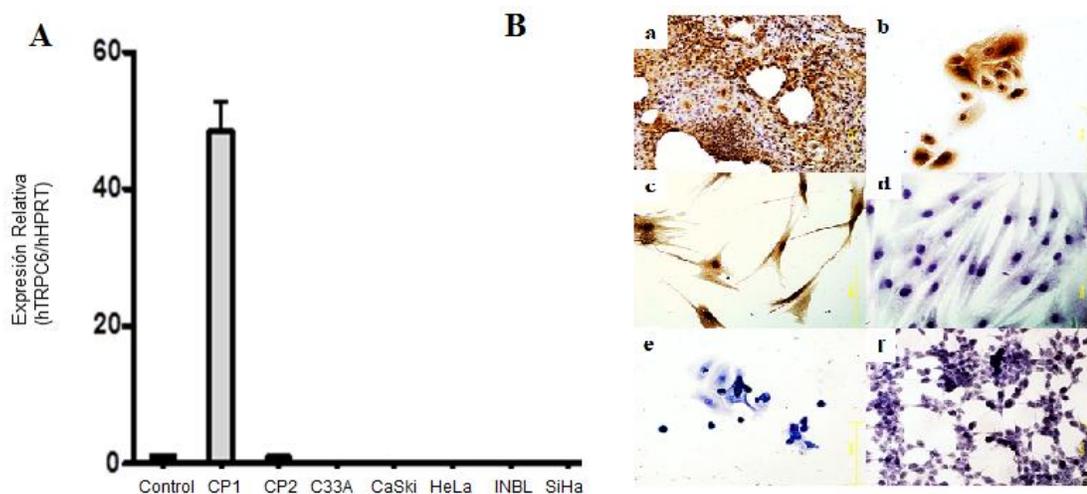


Figura 4. **Expresión de los canales TRPC6 en células de cáncer cervicouterino.** **A.** La expresión relativa de mRNA de los canales TRPC6 en líneas celulares de cáncer de cuello uterino y 2 cultivos primarios se determinó mediante RT-PCR en tiempo real. Se efectuaron tres réplicas experimentales. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE. \* =  $P < 0.05$  frente al control. **B.** La expresión a nivel de proteína de los canales TRPC6 se determinó por inmunocitoquímica. Una tinción café revela la presencia de las proteínas de los canales TRPC6. Tejido de pulmón humano fue usado como control positivo para el anti TRPC6 (a), queratinocitos normales humanos (b), CP1 (c), CP2 (d). En ausencia del anticuerpo primario (e) y en células LNCaP no se observa inmuno tinción café. Los resultados de inmucitoquímica correlacionan con aquellos obtenidos en el análisis de expresión génica. Aumento original 200 X, escala = 62.7  $\mu$ m.

### 6.3.2. El gen de los canales TRPC6 se encuentran hipermetilados en las células CaSki y SiHa

Como observamos que en todas las líneas celulares de cáncer cervicouterino probadas, el mRNA de los canales TRPC6 fue indetectable quisimos determinar si la metilación pudiera estar reprimiendo la expresión de los canales TRPC6 como ha sido reportado para otros canales de calcio [110]. Así que decidimos someter a las células a un tratamiento con 5-deoxiazacitidina, un agente desmetilante global., a tres diferentes concentraciones (200 nM, 1 μM y 2 μM) durante seis días. En la Fig. 5 se muestra que sólo en las células CaSki y SiHa tratadas con la 5-deoxiazacitidina a la mayor concentración probada (2 μM) se pudo detectar la expresión de los canales TRPC6, tanto a nivel de mRNA por RT-PCR en tiempo real (Fig. 5A) como de proteína mediante inmunocitoquímica (Fig. 5B) indicando una correlación entre ambos experimentos. No hubo inmuno-tinción en las células que no fueron tratadas con a 5-deoxiazacitidina (control) y en aquellas expuestas a DMSO (vehículo).

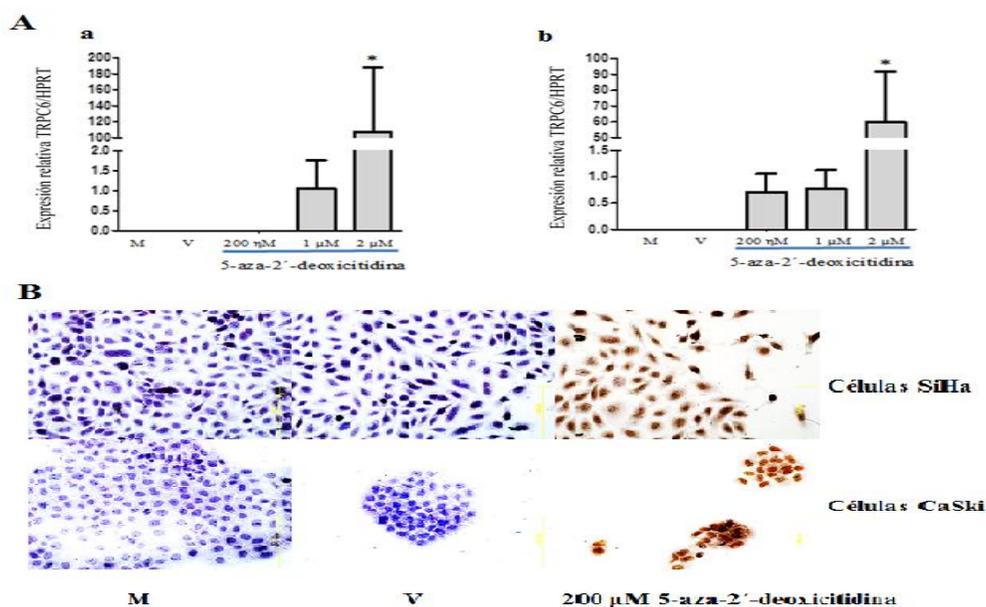


Figura 5. El tratamiento desmetilante induce la expresión de los canales TRPC6 en las células CaSki y SiHa. **A.** Expresión relativa del mRNA de los canales TRPC6 en células CaSki (a) y SiHa (b) bajo las siguientes condiciones, en presencia de medio (M), de DMSO (V) y de diferentes concentraciones de 5-aza-2'-deoxicitidina. Los datos son presentados como el promedio  $\pm$  DE de tres réplicas experimentales.  $P < 0.05$  vs. Control (\*). **B.** Expresión a nivel de proteína de los canales TRPC6 en células CaSki y SiHa bajo las siguientes condiciones, en presencia de medio (M), de DMSO (V) y de 200 μM de 5-aza-2'-deoxicitidina. Una tinción café, señal de la presencia de los canales TRPC6 se observa sólo en aquellas células sometidas al tratamiento con el agente desmetilante, datos, que correlacionan con los vistos en los estudios de expresión génica. Aumento original 200 X, escala = 62.7 μm.

### **6.3.3. Expresión de los canales TRPC6 en biopsias de cáncer cervicouterino**

Al igual que lo hicimos para los canales  $K_{ATP}$ , estudiamos la expresión a nivel de mRNA de los canales TRPC6 en 30 muestras de tejido canceroso (28 de carcinoma celular escamoso y 2 de adenocarcinoma). La expresión del mRNA fue normalizada con respecto a 1, como resultado de los valores obtenidos de 10 biopsias de pacientes con un cérvix no canceroso (Fig. 6A). De igual forma, determinamos la expresión a nivel de proteína de los canales TRPC6 en 30 biopsias de tejido cervical canceroso (24 carcinoma escamoso y 6 adenocarcinomas) mediante inmunohistoquímica y en 10 biopsias de tejido cervical no canceroso. Las biopsias de tejido cancerosos fueron obtenidas de pacientes diferentes de aquellas que participaron en el estudio de expresión génica. Se observó inmunotinción en todos los tejidos cervicales no cancerosos (10/10) (Fig. 6B). En contraste, sólo quince de las treinta muestras de cáncer cervical mostraron una tinción, en todos los casos, de menor intensidad con respecto al tejido control.

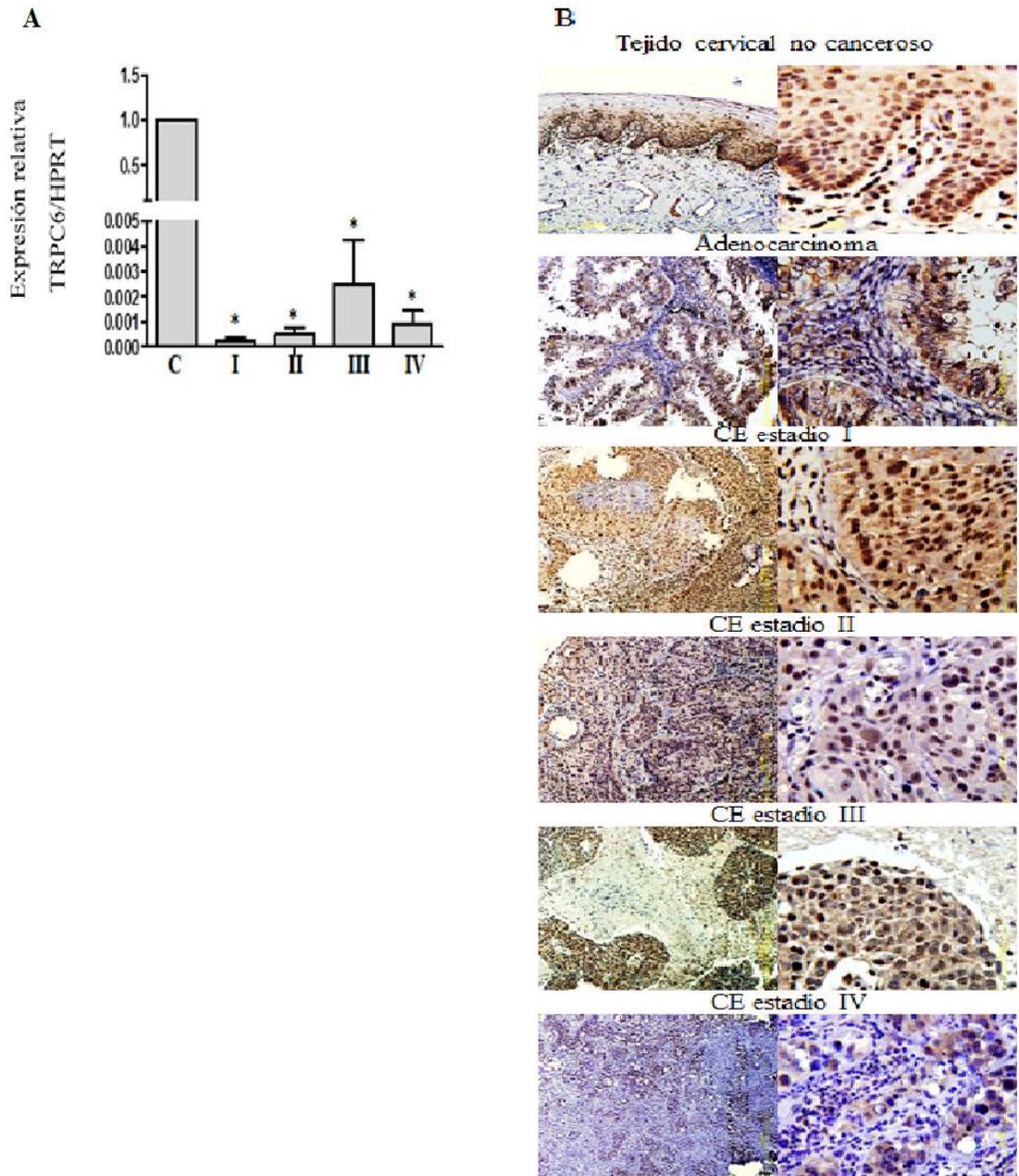


Figura 6. **Expresión de los canales TRPC6 en biopsias de cáncer cervicouterino.** **A.** Expresión relativa del mRNA de los canales TRPC6 en tejidos de cáncer cervicouterino de pacientes, las cuales fueron agrupadas en los diferentes estadios clínicos del carcinoma epidermoide desde el estadio I hasta el estadio IV. Todos los datos fueron normalizados al promedio de la expresión del mRNA de los canales TRPC6 en 10 tejidos de cérvix no canceroso (control). Los datos son presentados como el promedio  $\pm$  DE. Estadio I (n=4), estadio II (n=4), estadio III (n=4) y estadio IV (n=3).  $P < 0.05$  vs. Control (\*). **B.** Inmunohistoquímica de secciones seriales representativas de muestras quirúrgicas de tejido cervical no canceroso, de tejido de cérvix canceroso de adenocarcinoma y de carcinoma epidermoide desde los estadios clínicos I hasta el IV. Una tinción café es positiva para la presencia de los canales TRPC6 a los aumentos de 100 (escala = 251  $\mu$ m) y 400 (escala = 62.7  $\mu$ m). En todos los tejidos la señal correspondiente a la proteína de los canales TRPC6 se localizó predominantemente en el núcleo.

## 7. DISCUSIÓN

En este trabajo mostramos por primera vez la expresión de los canales  $K_{ATP}$  en líneas celulares de cáncer cervicouterino, así como en muestras de tejido tumoral. Observamos una diferencia en la expresión de dichos canales entre las diversas líneas celulares y entre las muestras de tejido cervical canceroso y no canceroso, reflejando una heterogeneidad entre el patrón de expresión de las líneas celulares y las muestras tumorales. La glibenclamida disminuye la proliferación celular de una manera más pronunciada en las células HeLa en comparación con los queratinocitos normales, usados como control. La glibenclamida, es una sulfonilurea que se une a todos los tipos de SUR, receptores que funcionan como las subunidades regulatorias de los canales  $K_{ATP}$ , provocando que los canales se cierren, inhibiendo así su actividad. Este fármaco ha sido ampliamente usado para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. Existen evidencias que señalan que la glibenclamida también tiene un papel antiproliferativo en diversas líneas celulares tanto normales como tumorales. De manera general, la apertura de los canales de  $K^+$  produce una hiperpolarización del potencial de membrana, proceso que es requerido para la progresión a través del ciclo celular. Como consecuencia, la administración de bloqueadores de canales de  $K^+$ , como la glibenclamida, inhiben la proliferación celular. Sin embargo, las sulfonilureas también pueden inhibir otras proteínas como al regulador de conductancia transmembrana de fibrosis cística (CFTR), que actúa como un canal de cloruro ( $Cl^-$ ) [111] y cuya expresión también ha sido detectada en el CaCu. De hecho, se ha demostrado que tanto a nivel de mRNA como de proteína, la expresión de CFTR incrementa gradualmente del tejido normal al tejido precanceroso (lesiones cervicales de bajo y alto grado) y tejido cervical canceroso. El nivel de expresión correlaciona con la progresión del cáncer cervical, con estadios más agresivos y con un pobre pronóstico, sugiriendo así, que el CFTR puede funcionar como un nuevo marcador tumoral, un marcador pronóstico y potencial blanco terapéutico para el CaCu [112]. Además, la glibenclamida puede inhibir la actividad de otras proteínas que pertenecen a la familia de los transportadores ABC, como proteínas de resistencia a multifármacos tipo 1 (MRP1), y tipo 2 (MRP2), encargadas de controlar la salida de algunos fármacos de la célula, como antraciclinas y la vincristina. Por su parte, la proteína MRP1 se ha visto sobreexpresada en diversos tumores [113]. Asimismo, las sulfonilureas pueden inhibir algunas proteínas intracelulares como la proteína cinasa A. También se ha documentado que las sulfonilureas se unen con gran afinidad a proteínas séricas [38].

Por otro lado, además de los efectos de la glibenclamida sobre la proliferación celular, también tiene efecto en otros procesos característicos del cáncer, como lo es la invasión. Particularmente, en células de carcinoma de ovario de células claras (ES-2), la administración de glibenclamida inhibió la invasión y la migración celular a través de la inhibición de la secreción del factor de crecimiento derivado de plaquetas, isoforma AA (PDGF-AA) [114]. Por lo anterior, pese a los efectos de la glibenclamida sobre los canales  $K_{ATP}$  no podemos descartar que otras proteínas pudieran relacionarse con los efectos antiproliferativos de la glibenclamida sobre las células HeLa. Sin embargo, pese a que más estudios son necesarios para precisar el mecanismo molecular que conlleva a los efectos antiproliferativos de la glibenclamida sobre las células HeLa, nuestros resultados sugieren a dicho fármaco como un potencial agente terapéutico para el tratamiento de las pacientes con cáncer cervicouterino que tengan una sobreexpresión de los canales  $K_{ATP}$ .

Las biopsias de tejidos cervicales mostraron una expresión diferencial del mRNA de la subunidad Kir6.2. Sin embargo, los niveles de expresión más altos observados corresponden a las muestras de pacientes con carcinoma epidermoide estadio IV, el estadio clínico más avanzado. Además, la sobreexpresión fue también relacionada con los tejidos invasivos y pobremente diferenciados. Una fuerte inmuno-tinción correspondiente a la expresión de la proteína de la subunidad Kir6.2 fue detectada en el 33% de las muestras de cáncer, mientras que en los tejidos cervicales no cancerosos sólo fue débilmente detectada la presencia de la proteína en una de las diez muestras analizadas. En ninguna de dichas muestras, fue detectada la presencia de la subunidad SUR2. Se ha demostrado que diversos canales de potasio contribuyen al desarrollo de la invasión y metástasis, por ejemplo, el Kv1.3 en melanoma [115]; Kv10.1 en leucemia mieloide aguda [116]; Kv11.1 en melanoma [117], leucemia mieloide aguda [118], neuroblastoma [119] y cáncer de colon [120]; Kir1.1 en carcinoma renal de células claras [121]; Kir4.2 en células de glioblastoma [122]; canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  de larga conductancia (BK) en células de glioma humanas [123, 124]; canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  de conductancia intermedia ( $IK_{Ca}$ ) en células de glioma [125, 126] y células de melanoma [120]; y canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  de pequeña conductancia (SK) en cánceres de hueso [127] y mama [128]. Aunque numerosas evidencias señalan que los canales de potasio están involucrados en la regulación de la migración e invasión celular, la vía de señalización precisa que regula

dichos procesos aún es desconocida. Hasta ahora, la función mejor caracterizada de los canales de potasio en su papel de promover la migración celular está relacionada con su capacidad de provocar cambios de volumen celular al modificar el flujo de potasio, ocasionando así, la fuerza motriz que permite la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$ . La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  incrementa la concentración intracelular de dicho ión, promoviendo así, la migración celular [128-131]. Por otro lado, algunos canales de potasio han sido asociados con algunas características patológicas de diferentes tipos de cáncer. Por ejemplo, los canales BK han sido asociados con la malignidad tumoral en gliomas [132].

En este trabajo tanto los canales  $\text{K}_{\text{ATP}}$  como los TRPC6 fueron identificados a nivel de proteína en muestras de pacientes con CaCu y en tejidos de cérvix no canceroso. En ambos tipos de tejidos la localización de ambos tipos de proteínas fue intracelular, ya sea en el citoplasma o en el núcleo. Existen varios reportes en donde se ha demostrado la presencia de canales iónicos en compartimentos intracelulares. Por ejemplo, el canal Kv10.1 ha sido identificado en la membrana interna del núcleo en donde puede interactuar con la heterocromatina, sugiriendo que de esta forma puede afectar la expresión de ciertos genes que son relevantes para el desarrollo del cáncer [133].

Aunque existen diversos reportes que muestran la sobreexpresión de los canales TRPC6 en diferentes células tumorales, inclusive en células de cáncer cervicouterino, en donde se relacionó el incremento en la expresión de los canales TRPC6 con un fenotipo de cáncer cervical agresivo [108], nuestros resultados muestran que en la mayoría de las biopsias de pacientes con cáncer cervicouterino la expresión a nivel de mRNA de los canales TRPC6 fue menor en comparación con los tejidos cervicales cancerosos. Mientras que en la mitad de las muestras analizadas por inmunohistoquímica no pudimos detectar la expresión a nivel de proteína de los canales TRPC6. El otro 50% de las muestras donde sí pudo ser detectada la proteína no hubo diferencia con respecto a la imuno-tinción mostrada por los controles e inclusive en el 20% de los casos la expresión de los canales TRPC6 en el tejido canceroso fue menor en comparación con los tejidos cervicales no cancerosos. Con el antecedente del artículo previo de los canales TRPC6 en células de cáncer cervicouterino en donde se mostraron resultados completamente inversos a los obtenidos en este trabajo, decidimos evaluar la expresión a nivel de proteína de los canales

TRPC6 con el mismo anticuerpo probado en dicho trabajo, así como a la misma dilución y tiempo de incubación (1:800, Abcam). Sin embargo, aún en las mismas condiciones, nuestros resultados mostraron una menor expresión de los canales TRPC6 a nivel de proteína en las muestras de cáncer cervicouterino con respecto a las muestras de cérvix no canceroso lo cual descarta que la diferencia en los resultados se deba a cuestiones técnicas. Sin embargo, existen reportes sobre diversos canales iónicos cuya expresión en los tejidos cancerosos es menor con respecto a los correspondientes tejidos sanos. Por ejemplo, se ha demostrado que la baja expresión del canal  $K_v7.1$  en el cáncer colorectal está asociada con una pobre supervivencia, lo que sugiere que dicho canal puede estar funcionando como un gen supresor de tumores [134]. Otros experimentos muestran que el canal  $K_v1.3$  a nivel de proteína se encuentra disminuido en el adenocarcinoma de mama comparado con el tejido normal [135]. Canales pertenecientes a la familia TRP, como el TRPM1, también han sido propuestos como genes supresores de tumores y como marcadores pronósticos ya que el mRNA de dichos canales se ha encontrado incrementado en el tejido dérmico benigno mientras que su expresión se encuentra disminuida en melanomas primarios y ya no es detectable en melanomas metastásicos [136-138]. Por último, se ha demostrado que el canal P2X7R, canal catiónico sensible a ATP, se encuentra sobreexpresado en diversos tumores como leucemia [139, 140]; próstata [141]; mama [142]; neuroblastoma [143] y tiroides [144] en comparación a los respectivos tejidos normales. Particularmente, en el cáncer cervicouterino, una disminución en la expresión del P2X7R ha sido reportada, proponiéndose así, a dicho canal como un nuevo biomarcador que diferencia los tejidos uterinos epiteliales normales de los cancerosos [84].

Los cambios en los niveles de expresión de los canales iónicos pueden ocurrir por cambios a nivel genómico, transcripcional, post-traducciona l o epigenético [26]. Particularmente, los cambios epigenéticos como la hipermetilación de las islas CpG en las regiones promotoras de ciertos genes provocan la inactivación de genes supresores de tumores que conllevan al desarrollo de un fenotipo maligno. Existen muchos estudios que demuestran que existe una gran cantidad de genes que están frecuentemente metilados en distintos tipos de cánceres [145, 146] por lo que no es sorprendente que existan evidencias que señalan que un gran número de alteraciones epigenéticas ocurran a lo largo de los distintos estadios de desarrollo de la carcinogénesis cervical como la hipermetilación de regiones promotoras de genes supresores de tumores [147-150].

Nuestros resultados muestran que el mRNA de los canales TRPC6 fue indetectable en todas las líneas de cáncer cervicouterino probadas (C33A, CaSki, HeLa, INBL y SiHa) mediante RT-PCR en tiempo real, y después, al usar un tratamiento con un agente desmetilante global, la 5-deoxiazacitidina nosotros pudimos detectar, tanto el mRNA como la proteína de los canales TRPC6 en las células CaSki y SiHa, sugiriendo la posible hipermetilación del gen TRPC6. De la misma manera, la hipermetilación ha sido reportada como uno de los potenciales cambios que alteran la expresión de los canales iónicos en diversos cánceres. Por ejemplo, el CACNA1G, gen que codifica para el canal Cav3.1, se ha encontrado frecuentemente hipermetilado en algunos tipos de cánceres como colorectal [110, 151]; gástrico [110]; leucemia [110]; adenocarcinoma pancreático [152] y tumores de vejiga [153]. El gen KCNA3 que codifica para el canal Kv1.3 se encuentra hipermetilado en el adenocarcinoma mamario [135]. Mientras que el KCNH5, gen que codifica para el Kv10.2 se encuentra hipermetilado en el cáncer pulmonar y de células no pequeñas [154] y CACNA1A, gen que codifica para el canal Cav2.1 se encuentra metilado en cánceres de vejiga [153]. Hasta ahora, la causa de la metilación de dichos genes codificantes para diversos canales iónicos es desconocida, sin embargo, se postula, que su inactivación puede ser fundamental para el desarrollo y progresión del cáncer.

Además de los cambios epigenéticos, la regulación a la baja de los canales TRPC6 en el CaCu, también pudiera explicarse por un mecanismo relacionado con p53. Se ha demostrado que p53 se une directamente a un elemento de respuesta de 22 pares de bases que se encuentra en la región promotora del gen *trpc6*, incrementando su expresión tanto a nivel de mRNA como de proteína y la sobreexpresión de los canales TRPC6 promueve la apoptosis [155].

Existe una excepcional heterogeneidad y adaptabilidad en los procesos característicos del cáncer. Tan solo, existe una amplia clasificación de los tumores desarrollados en el cérvix por sus características histopatológicas, lo que refleja una amplia variabilidad entre las propias células dentro de un mismo tipo de tumor. Por lo que se postula que a nivel molecular no existen 2 tumores iguales. La heterogeneidad de los tumores se refleja en los diferentes patrones de expresión de proteínas, en su respuesta a los fármacos y en la recurrencia por mencionar algunos ejemplos [156]. Dicha heterogeneidad también se refleja en la expresión de los canales estudiados, pero resulta muy interesante a nivel clínico que haya subgrupos de tumores que

sobreexpresan el canal Kir6.2 y que se asocien con un mayor estadio clínico, fenotipo invasivo y pobre diferenciación.

Definitivamente muchos estudios son necesarios para elucidar el papel de los canales  $K_{ATP}$  en la progresión del cáncer cervical, así como en su malignidad.

## **8. CONCLUSIÓN**

En conclusión, nuestros resultados sugieren a los canales  $K_{ATP}$  y TRPC6 como potenciales herramientas para el diagnóstico, el pronóstico y la terapia del cáncer cervical. Los canales  $K_{ATP}$  pueden ser las bases para una nueva intervención terapéutica en las pacientes con cáncer cervical que sobreexpresen dichas proteínas. Mientras que los canales TRPC6 pudieran estar desempeñando un papel muy importante para el desarrollo y progresión del cáncer cervicouterino y pudieran ser considerados como posibles genes supresores de tumores en este tipo de cáncer

## 9. FIGURAS COMPLEMENTARIAS

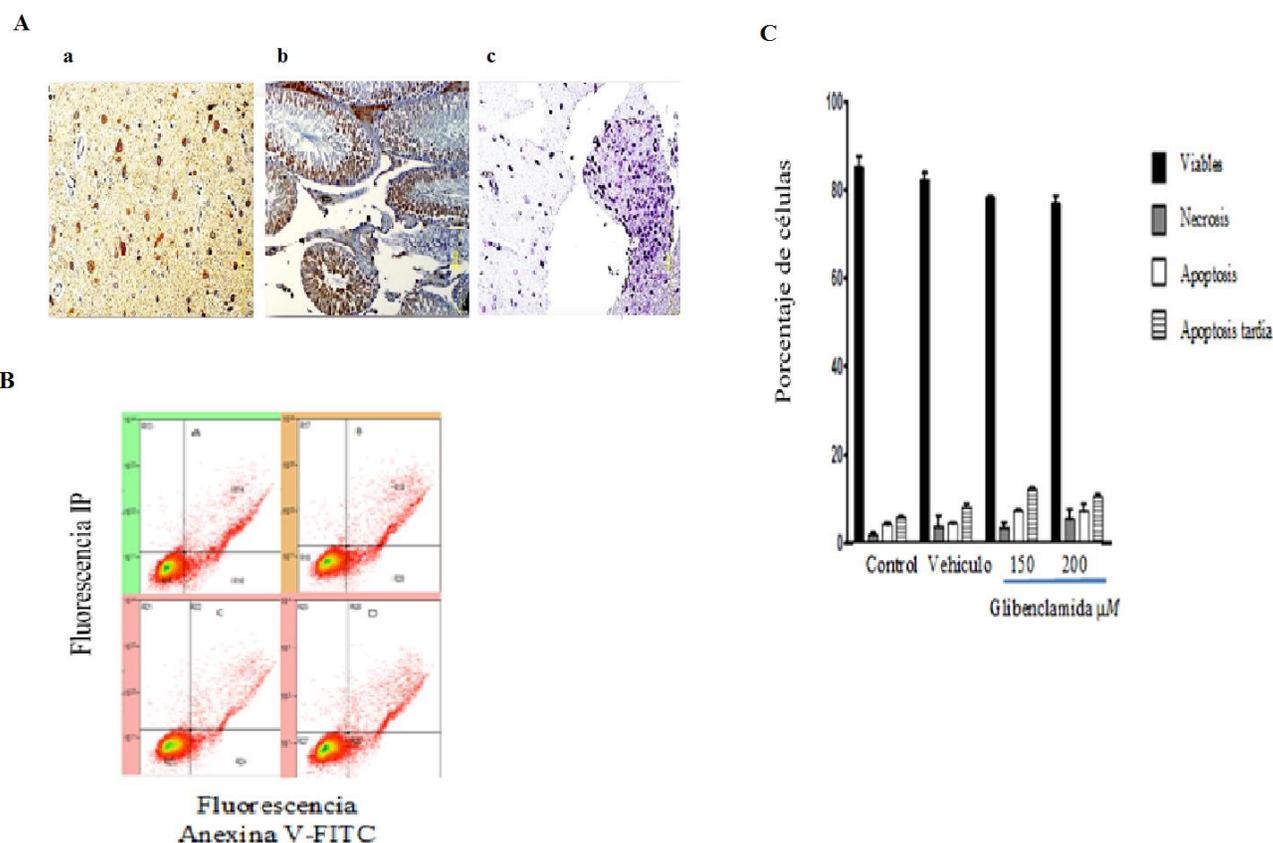


Figura complementaria 1. **A.** Tejidos controles usados en inmunohistoquímica. Corteza cerebral humana fue usada como control positivo para el anticuerpo de la subunidad Kir6.2 (a). Testículos de rata fueron usados como control positivo para la expresión de la subunidad SUR2 (b). Control negativo. Corte de corteza cerebral humana en donde no se observó tinción café en ausencia del anticuerpo primario (c). Magnificación original x 200. **B.** Ensayo de apoptosis en las células HeLa. Las letras en cada cuadrante representan A; las células sin tratamiento, B; células tratadas con vehículo (agua estéril) C; células tratadas con glibenclamida (150  $\mu\text{M}$ ) y D; células tratadas con glibenclamida (200  $\mu\text{M}$ ). Las células viables no unen anexina V ni al IP (ioduro de propidio) y se detectan en el cuadrante inferior izquierdo. Células en apoptosis tardía se unen tanto a la anexina V como al IP y se detectan en el cuadrante superior derecho. Las células en apoptosis temprana se unen solamente anexina V y se detectan en el cuadrante inferior derecho. Mientras que las células necróticas se unen al IP y se detectan en el cuadrante superior izquierdo. **C.** La Glibenclamida no aumentó el número de células apoptóticas en cualquiera de las condiciones analizadas por la tinción con Anexina-V después de 48 h de tratamiento. Tres diferentes cultivos celulares fueron probados con 3 repeticiones experimentales. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
2. Walboomers, J.M., et al., *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide*. J Pathol, 1999. **189**(1): p. 12-9.
3. zur Hausen, H., *Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(5): p. 342-50.
4. Burd, E.M., *Human Papillomavirus and Cervical Cancer*. Clinical Microbiology Reviews, 2003. **16**(1): p. 1-17.
5. Mantovani, F. and L. Banks, *The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression*. Oncogene, 2001. **20**(54): p. 7874-87.
6. Boyer, S.N., D.E. Wazer, and V. Band, *E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway*. Cancer Res, 1996. **56**(20): p. 4620-4.
7. Frazer, I.H., *Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(1): p. 46-54.
8. Castellsague, X. and N. Munoz, *Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking*. J Natl Cancer Inst Monogr, 2003(31): p. 20-8.
9. Franco, E.L., E. Duarte-Franco, and A. Ferenczy, *Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection*. CMAJ: Canadian Medical Association Journal, 2001. **164**(7): p. 1017-1025.
10. Schiffman, M., et al., *Human papillomavirus and cervical cancer*. Lancet, 2007. **370**(9590): p. 890-907.
11. Pecorelli, S., L. Zigliani, and F. Odicino, *Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix*. Int J Gynaecol Obstet, 2009. **105**(2): p. 107-8.
12. Duenas-Gonzalez, A., et al., *Modern management of locally advanced cervical carcinoma*. Cancer Treat Rev, 2003. **29**(5): p. 389-99.
13. Papanikolaou, A., et al., *Results on the treatment of uterine cervix cancer: ten years experience*. Eur J Gynaecol Oncol, 2006. **27**(6): p. 607-10.
14. Ayhan, A., et al., *Prognostic factors in FIGO stage IB cervical cancer without lymph node metastasis and the role of adjuvant radiotherapy after radical hysterectomy*. Int J Gynecol Cancer, 2004. **14**(2): p. 286-92.
15. Grisar, D.A., et al., *Histopathologic score predicts recurrence free survival after radical surgery in patients with stage IA2-IB1-2 cervical carcinoma*. Cancer, 2003. **97**(8): p. 1904-8.
16. Piura, B., A. Rabinovich, and M. Friger, *Recurrent cervical carcinoma after radical hysterectomy and pelvic lymph node dissection: a study of 32 cases*. Eur J Gynaecol Oncol, 2008. **29**(1): p. 31-6.
17. Sandhiya, S. and S.A. Dkhar, *Potassium channels in health, disease & development of channel modulators*. Indian J Med Res, 2009. **129**(3): p. 223-32.
18. Prevarskaya, N., R. Skryma, and Y. Shuba, *Ion channels and the hallmarks of cancer*. Trends Mol Med, 2010. **16**(3): p. 107-21.
19. Arcangeli, A. and A. Becchetti, *New Trends in Cancer Therapy: Targeting Ion Channels and Transporters*. Pharmaceuticals, 2010. **3**(4): p. 1202.

20. Huang, X. and L.Y. Jan, *Targeting potassium channels in cancer*. J Cell Biol, 2014. **206**(2): p. 151-62.
21. Becchetti, A., *Ion channels and transporters in cancer. 1. Ion channels and cell proliferation in cancer*. Am J Physiol Cell Physiol, 2011. **301**(2): p. C255-65.
22. Kunzelmann, K., *Ion Channels and Cancer*. The Journal of Membrane Biology, 2005. **205**(3): p. 159-173.
23. Fiske, J.L., et al., *Voltage-sensitive ion channels and cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(3): p. 493-500.
24. Lang, F., et al., *Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death*. J Membr Biol, 2005. **205**(3): p. 147-57.
25. Aguilar-Bryan, L., et al., *Toward understanding the assembly and structure of KATP channels*. Physiol Rev, 1998. **78**(1): p. 227-45.
26. Pardo, L.A. and W. Stuhmer, *The roles of K<sup>+</sup> channels in cancer*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(1): p. 39-48.
27. Yamada, M., et al., *Sulphonylurea receptor 2B and Kir6.1 form a sulphonylurea-sensitive but ATP-insensitive K<sup>+</sup> channel*. J Physiol, 1997. **499** ( Pt 3): p. 715-20.
28. Shyng, S. and C.G. Nichols, *Octameric stoichiometry of the KATP channel complex*. J Gen Physiol, 1997. **110**(6): p. 655-64.
29. Babenko, A.P., L. Aguilar-Bryan, and J. Bryan, *A view of sur/KIR6.X, KATP channels*. Annu Rev Physiol, 1998. **60**: p. 667-87.
30. Inagaki, N., et al., *A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels*. Neuron, 1996. **16**(5): p. 1011-7.
31. Aguilar-Bryan, L. and J. Bryan, *Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels*. Endocr Rev, 1999. **20**(2): p. 101-35.
32. Ashcroft, F.M. and F.M. Gribble, *New windows on the mechanism of action of K(ATP) channel openers*. Trends Pharmacol Sci, 2000. **21**(11): p. 439-45.
33. Noma, A., *ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle*. Nature, 1983. **305**(5930): p. 147-8.
34. Ningaraj, N.S., et al., *Activation of KATP channels increases anticancer drug delivery to brain tumors and survival*. Eur J Pharmacol, 2009. **602**(2-3): p. 188-93.
35. Ashcroft, F.M., *Adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels*. Annu Rev Neurosci, 1988. **11**: p. 97-118.
36. Malhi, H., et al., *KATP channels regulate mitogenically induced proliferation in primary rat hepatocytes and human liver cell lines. Implications for liver growth control and potential therapeutic targeting*. J Biol Chem, 2000. **275**(34): p. 26050-7.
37. Miller, T.R., et al., *Pharmacological and molecular characterization of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the TE671 human medulloblastoma cell line*. European Journal of Pharmacology, 1999. **370**(2): p. 179-185.
38. Wondergem, R., et al., *Membrane potassium channels and human bladder tumor cells: II. Growth properties*. J Membr Biol, 1998. **161**(3): p. 257-62.
39. Nunez, M., et al., *Glibenclamide inhibits cell growth by inducing G0/G1 arrest in the human breast cancer cell line MDA-MB-231*. BMC Pharmacol Toxicol, 2013. **14**: p. 6.
40. Qian, X., et al., *Glibenclamide exerts an antitumor activity through reactive oxygen species-c-jun NH2-terminal kinase pathway in human gastric cancer cell line MGC-803*. Biochem Pharmacol, 2008. **76**(12): p. 1705-15.
41. Huang, L., et al., *ATP-sensitive potassium channels control glioma cells proliferation by regulating ERK activity*. Carcinogenesis, 2009. **30**(5): p. 737-44.

42. Abdul, M. and N. Hoosein, *Expression and activity of potassium ion channels in human prostate cancer*. *Cancer Lett*, 2002. **186**(1): p. 99-105.
43. Iwakura, T., et al., *Sustained enhancement of Ca(2+) influx by glibenclamide induces apoptosis in RINm5F cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **271**(2): p. 422-8.
44. Ningaraj, N.S., M.K. Rao, and K.L. Black, *Adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channel-mediated blood-brain tumor barrier permeability increase in a rat brain tumor model*. *Cancer Res*, 2003. **63**(24): p. 8899-911.
45. Rong, Z., et al., *Combined treatment of glibenclamide and CoCl<sub>2</sub> decreases MMP9 expression and inhibits growth in highly metastatic breast cancer*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2013. **32**: p. 32.
46. Gees, M., B. Colsoul, and B. Nilius, *The role of transient receptor potential cation channels in Ca<sup>2+</sup> signaling*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010. **2**(10): p. a003962.
47. Montell, C., L. Birnbaumer, and V. Flockerzi, *The TRP Channels, a Remarkably Functional Family*. *Cell*. **108**(5): p. 595-598.
48. Chen, J., et al., *Transient receptor potential (TRP) channels, promising potential diagnostic and therapeutic tools for cancer*. *Biosci Trends*, 2014. **8**(1): p. 1-10.
49. Monteith, G.R., F.M. Davis, and S.J. Roberts-Thomson, *Calcium channels and pumps in cancer: changes and consequences*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(38): p. 31666-73.
50. Ouadid-Ahidouch, H., et al., *TRP channels: diagnostic markers and therapeutic targets for breast cancer?* *Trends Mol Med*, 2013. **19**(2): p. 117-24.
51. Smani, T., et al., *Functional and physiopathological implications of TRP channels*. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1853**(8): p. 1772-1782.
52. Hofmann, T., et al., *Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol*. *Nature*, 1999. **397**(6716): p. 259-63.
53. Hisatsune, C., et al., *Regulation of TRPC6 channel activity by tyrosine phosphorylation*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(18): p. 18887-94.
54. Trebak, M., *Canonical transient receptor potential channels in disease: targets for novel drug therapy?* *Drug Discov Today*, 2006. **11**(19-20): p. 924-30.
55. Dietrich, A. and T. Gudermann, *TRPC6*. *Handb Exp Pharmacol*, 2007(179): p. 125-41.
56. Aydar, E., et al., *Abnormal expression, localization and interaction of canonical transient receptor potential ion channels in human breast cancer cell lines and tissues: a potential target for breast cancer diagnosis and therapy*. *Cancer Cell Int*, 2009. **9**: p. 23.
57. Dhennin-Duthille, I., et al., *High expression of transient receptor potential channels in human breast cancer epithelial cells and tissues: correlation with pathological parameters*. *Cell Physiol Biochem*, 2011. **28**(5): p. 813-22.
58. Guilbert, A., et al., *Expression of TRPC6 channels in human epithelial breast cancer cells*. *BMC Cancer*, 2008. **8**: p. 125.
59. Cai, R., et al., *Blockade of TRPC6 channels induced G2/M phase arrest and suppressed growth in human gastric cancer cells*. *Int J Cancer*, 2009. **125**(10): p. 2281-7.
60. El Boustany, C., et al., *Capacitative calcium entry and transient receptor potential canonical 6 expression control human hepatoma cell proliferation*. *Hepatology*, 2008. **47**(6): p. 2068-77.
61. Song, J., et al., *Critical role of TRPC6 channels in the development of human renal cell carcinoma*. *Mol Biol Rep*, 2013. **40**(8): p. 5115-22.
62. Shi, Y., et al., *Critical role of TRPC6 channels in G2 phase transition and the development of human oesophageal cancer*. *Gut*, 2009. **58**: p. 1443 - 1450.

63. Ding, X., et al., *Essential role of TRPC6 channels in G2/M phase transition and development of human glioma*. J Natl Cancer Inst, 2010. **102**(14): p. 1052-68.
64. Chigurupati, S., et al., *Receptor channel TRPC6 is a key mediator of Notch-driven glioblastoma growth and invasiveness*. Cancer Res, 2010. **70**(1): p. 418-27.
65. Yue, D., et al., *Expression of TRPC6 in benign and malignant human prostate tissues*. Asian J Androl, 2009. **11**(5): p. 541-7.
66. Wang, Y., et al., *The role of TRPC6 in HGF-induced cell proliferation of human prostate cancer DU145 and PC3 cells*. Asian J Androl, 2010. **12**(6): p. 841-52.
67. Bernaldo de Quiros, S., et al., *Identification of TRPC6 as a possible candidate target gene within an amplicon at 11q21-q22.2 for migratory capacity in head and neck squamous cell carcinomas*. BMC Cancer, 2013. **13**(1): p. 116.
68. Jiang, H.N., et al., *Involvement of TRPC channels in lung cancer cell differentiation and the correlation analysis in human non-small cell lung cancer*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e67637.
69. Thebault, S., et al., *Differential role of transient receptor potential channels in Ca<sup>2+</sup> entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells*. Cancer Res, 2006. **66**(4): p. 2038-47.
70. Ge, R., et al., *Critical role of TRPC6 channels in VEGF-mediated angiogenesis*. Cancer Lett, 2009. **283**(1): p. 43-51.
71. Zhang, S.S., et al., *High expression of transient potential receptor C6 correlated with poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma*. Med Oncol, 2013. **30**(3): p. 607.
72. Schwiebert, E.M., et al., *GTP-binding proteins inhibit cAMP activation of chloride channels in cystic fibrosis airway epithelial cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992. **89**(22): p. 10623-10627.
73. Wagner, J.A., et al., *Activation of chloride channels in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells by multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase*. Nature, 1991. **349**(6312): p. 793-6.
74. Shen, M.R., et al., *Differential expression of volume-regulated anion channels during cell cycle progression of human cervical cancer cells*. J Physiol, 2000. **529 Pt 2**: p. 385-94.
75. Kirk, K. and J. Kirk, *Volume-regulatory taurine release from a human lung cancer cell line. Evidence for amino acid transport via a volume-activated chloride channel*. FEBS Lett, 1993. **336**(1): p. 153-8.
76. Rasola, A., et al., *Ionic selectivity of volume-sensitive currents in human epithelial cells*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1139**(4): p. 319-23.
77. Chou, C.Y., M.R. Shen, and S.N. Wu, *Volume-sensitive chloride channels associated with human cervical carcinogenesis*. Cancer Res, 1995. **55**(24): p. 6077-83.
78. Mao, J., et al., *Volume-activated chloride channels contribute to cell-cycle-dependent regulation of HeLa cell migration*. Biochem Pharmacol, 2009. **77**(2): p. 159-68.
79. Ralevic, V. and G. Burnstock, *Receptors for purines and pyrimidines*. Pharmacol Rev, 1998. **50**(3): p. 413-92.
80. Harden, T.K., J.L. Boyer, and R.A. Nicholas, *P2-purinergic receptors: subtype-associated signaling responses and structure*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1995. **35**: p. 541-79.
81. Gorodeski, G.I., et al., *Biphasic regulation of paracellular permeability in human cervical cells by two distinct nucleotide receptors*. Am J Physiol, 1995. **268**(5 Pt 1): p. C1215-26.

82. Gorodeski, G.I., *Expression, regulation, and function of P2X(4) purinergic receptor in human cervical epithelial cells*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002. **282**(1): p. C84-93.
83. Wang, Q., et al., *P2X7 receptor-mediated apoptosis of human cervical epithelial cells*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. **287**(5): p. C1349-58.
84. Li, X., et al., *The P2X7 receptor: a novel biomarker of uterine epithelial cancers*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006. **15**(10): p. 1906-13.
85. Feng, Y.H., et al., *A truncated P2X7 receptor variant (P2X7-j) endogenously expressed in cervical cancer cells antagonizes the full-length P2X7 receptor through hetero-oligomerization*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(25): p. 17228-37.
86. Catterall, W.A., A.L. Goldin, and S.G. Waxman, *International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels*. *Pharmacol Rev*, 2005. **57**(4): p. 397-409.
87. Brackenbury, W.J., M.B. Djamgoz, and L.L. Isom, *An emerging role for voltage-gated Na<sup>+</sup> channels in cellular migration: regulation of central nervous system development and potentiation of invasive cancers*. *Neuroscientist*, 2008. **14**(6): p. 571-83.
88. Chioni, A.M., et al., *Protein kinase A and regulation of neonatal Nav1.5 expression in human breast cancer cells: activity-dependent positive feedback and cellular migration*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010. **42**(2): p. 346-58.
89. Fraser, S.P., et al., *Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(15): p. 5381-9.
90. Roger, S., et al., *Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007. **39**(4): p. 774-86.
91. Diss, J.K.J., et al., *A potential novel marker for human prostate cancer: voltage-gated sodium channel expression in vivo*. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2005. **8**(3): p. 266-273.
92. House, C.D., et al., *Voltage-gated Na<sup>+</sup> channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion*. *Cancer Res*, 2010. **70**(17): p. 6957-67.
93. Gao, R., et al., *Expression of voltage-gated sodium channel alpha subunit in human ovarian cancer*. *Oncol Rep*, 2010. **23**(5): p. 1293-9.
94. Hernandez-Plata, E., et al., *Overexpression of NaV 1.6 channels is associated with the invasion capacity of human cervical cancer*. *Int J Cancer*, 2012. **130**(9): p. 2013-23.
95. Diaz, D., et al., *Functional expression of voltage-gated sodium channels in primary cultures of human cervical cancer*. *J Cell Physiol*, 2007. **210**(2): p. 469-78.
96. Farias, L.M., et al., *Ether a go-go potassium channels as human cervical cancer markers*. *Cancer Res*, 2004. **64**(19): p. 6996-7001.
97. de Guadalupe Chavez-Lopez, M., et al., *Antiproliferative and proapoptotic effects of astemizole on cervical cancer cells*. *Int J Gynecol Cancer*, 2014. **24**(5): p. 824-8.
98. Ortiz, C.S., et al., *Eag1 potassium channels as markers of cervical dysplasia*. *Oncol Rep*, 2011. **26**(6): p. 1377-83.
99. 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.
100. McManus, O.B., *Calcium-activated potassium channels: regulation by calcium*. *J Bioenerg Biomembr*, 1991. **23**(4): p. 537-60.
101. Golding, N.L., et al., *Dendritic calcium spike initiation and repolarization are controlled by distinct potassium channel subtypes in CA1 pyramidal neurons*. *J Neurosci*, 1999. **19**(20): p. 8789-98.

102. Poolos, N.P. and D. Johnston, *Calcium-activated potassium conductances contribute to action potential repolarization at the soma but not the dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons*. J Neurosci, 1999. **19**(13): p. 5205-12.
103. Lingle, C.J., et al., *Calcium-activated potassium channels in adrenal chromaffin cells*. Ion Channels, 1996. **4**: p. 261-301.
104. Brenner, R., et al., *Vasoregulation by the [beta]1 subunit of the calcium-activated potassium channel*. Nature, 2000. **407**(6806): p. 870-876.
105. Turnheim, K., et al., *Reconstitution of a calcium-activated potassium channel in basolateral membranes of rabbit colonocytes into planar lipid bilayers*. J Membr Biol, 1989. **112**(3): p. 247-54.
106. Soroceanu, L., T.J. Manning, Jr., and H. Sontheimer, *Modulation of glioma cell migration and invasion using Cl(-) and K(+) ion channel blockers*. J Neurosci, 1999. **19**(14): p. 5942-54.
107. Han, X., et al., *Heat shock proteins and p53 play a critical role in K+ channel-mediated tumor cell proliferation and apoptosis*. Apoptosis, 2007. **12**(10): p. 1837-46.
108. Wan, Q., et al., *Expression of transient receptor potential channel 6 in cervical cancer*. Onco Targets Ther, 2012. **5**: p. 171-6.
109. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
110. Toyota, M., et al., *Inactivation of CACNA1G, a T-type calcium channel gene, by aberrant methylation of its 5' CpG island in human tumors*. Cancer Res, 1999. **59**(18): p. 4535-41.
111. Sheppard, D.N. and M.J. Welsh, *Effect of ATP-sensitive K+ channel regulators on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride currents*. J Gen Physiol, 1992. **100**(4): p. 573-91.
112. Peng, X., et al., *Overexpression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is associated with human cervical cancer malignancy, progression and prognosis*. Gynecol Oncol, 2012. **125**(2): p. 470-6.
113. Payen, L., et al., *The sulphonylurea glibenclamide inhibits multidrug resistance protein (MRP1) activity in human lung cancer cells*. British Journal of Pharmacology, 2001. **132**(3): p. 778-784.
114. Yasukagawa, T., et al., *Suppression of cellular invasion by glybenclamide through inhibited secretion of platelet-derived growth factor in ovarian clear cell carcinoma ES-2 cells*. FEBS Lett, 2012. **586**(10): p. 1504-9.
115. Artym, V.V. and H.R. Petty, *Molecular proximity of Kv1.3 voltage-gated potassium channels and beta(1)-integrins on the plasma membrane of melanoma cells: effects of cell adherence and channel blockers*. J Gen Physiol, 2002. **120**(1): p. 29-37.
116. Agarwal, J.R., et al., *The potassium channel Ether à go-go is a novel prognostic factor with functional relevance in acute myeloid leukemia*. Molecular Cancer, 2010. **9**(1): p. 1-16.
117. Afrasiabi, E., et al., *Expression and significance of HERG (KCNH2) potassium channels in the regulation of MDA-MB-435S melanoma cell proliferation and migration*. Cell Signal, 2010. **22**(1): p. 57-64.
118. Pillozzi, S., et al., *VEGFR-1 (FLT-1), beta1 integrin, and hERG K+ channel for a macromolecular signaling complex in acute myeloid leukemia: role in cell migration and clinical outcome*. Blood, 2007. **110**(4): p. 1238-50.

119. Cherubini, A., et al., *Human ether-a-go-go-related gene 1 channels are physically linked to beta1 integrins and modulate adhesion-dependent signaling*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(6): p. 2972-83.
120. Lastraioli, E., et al., *herg1 gene and HERG1 protein are overexpressed in colorectal cancers and regulate cell invasion of tumor cells*. Cancer Res, 2004. **64**(2): p. 606-11.
121. Guo, Z., et al., *KCNJ1 inhibits tumor proliferation and metastasis and is a prognostic factor in clear cell renal cell carcinoma*. Tumour Biol, 2015. **36**(2): p. 1251-9.
122. Veeravalli, K.K., et al., *Integrin alpha9beta1-mediated cell migration in glioblastoma via SSAT and Kir4.2 potassium channel pathway*. Cell Signal, 2012. **24**(1): p. 272-81.
123. Kraft, R., et al., *BK channel openers inhibit migration of human glioma cells*. Pflugers Arch, 2003. **446**(2): p. 248-55.
124. Weaver, A.K., V.C. Bomben, and H. Sontheimer, *Expression and Function of Calcium-Activated Potassium Channels in Human Glioma Cells*. Glia, 2006. **54**(3): p. 223-233.
125. Sciacaluga, M., et al., *CXCL12-induced glioblastoma cell migration requires intermediate conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel activity*. Am J Physiol Cell Physiol, 2010. **299**(1): p. C175-84.
126. Cuddapah, V.A., et al., *Bradykinin-induced chemotaxis of human gliomas requires the activation of KCa3.1 and ClC-3*. J Neurosci, 2013. **33**(4): p. 1427-40.
127. Chantome, A., et al., *Pivotal role of the lipid Raft SK3-Orail complex in human cancer cell migration and bone metastases*. Cancer Res, 2013. **73**(15): p. 4852-61.
128. Potier, M., et al., *Identification of SK3 channel as a new mediator of breast cancer cell migration*. Mol Cancer Ther, 2006. **5**(11): p. 2946-53.
129. *Expression and Role of the Intermediate-Conductance Calcium-Activated Potassium Channel KCa3.1 in Glioblastoma*. Journal of Signal Transduction, 2012. **2012**: p. 11.
130. Schwab, A., et al., *Role of ion channels and transporters in cell migration*. Physiol Rev, 2012. **92**(4): p. 1865-913.
131. Schwab, A. and C. Stock, *Ion channels and transporters in tumour cell migration and invasion*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2014. **369**(1638): p. 20130102.
132. Liu, X., et al., *Cloning and characterization of glioma BK, a novel BK channel isoform highly expressed in human glioma cells*. J Neurosci, 2002. **22**(5): p. 1840-9.
133. Chen, Y., et al., *Functional K(V)10.1 Channels Localize to the Inner Nuclear Membrane*. PLoS ONE, 2011. **6**(5): p. e19257.
134. Than, B.L., et al., *The role of KCNQ1 in mouse and human gastrointestinal cancers*. Oncogene, 2014. **33**(29): p. 3861-8.
135. Brevet, M., et al., *DNA methylation of K(v)1.3 potassium channel gene promoter is associated with poorly differentiated breast adenocarcinoma*. Cell Physiol Biochem, 2009. **24**(1-2): p. 25-32.
136. Duncan, L.M., et al., *Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis*. Cancer Res, 1998. **58**(7): p. 1515-20.
137. Deeds, J., F. Cronin, and L.M. Duncan, *Patterns of melastatin mRNA expression in melanocytic tumors*. Hum Pathol, 2000. **31**(11): p. 1346-56.
138. Duncan, L.M., et al., *Melastatin expression and prognosis in cutaneous malignant melanoma*. J Clin Oncol, 2001. **19**(2): p. 568-76.
139. Zhang, X.J., et al., *Expression of P2X7 in human hematopoietic cell lines and leukemia patients*. Leuk Res, 2004. **28**(12): p. 1313-22.
140. Adinolfi, E., et al., *P2X7 receptor expression in evolutive and indolent forms of chronic B lymphocytic leukemia*. Blood, 2002. **99**(2): p. 706-8.

141. Slater, M., et al., *Early prostate cancer detected using expression of non-functional cytolytic P2X7 receptors*. *Histopathology*, 2004. **44**(3): p. 206-15.
142. Slater, M., et al., *Differentiation between cancerous and normal hyperplastic lobules in breast lesions*. *Breast Cancer Res Treat*, 2004. **83**(1): p. 1-10.
143. Raffaghello, L., et al., *The P2X7 receptor sustains the growth of human neuroblastoma cells through a substance P-dependent mechanism*. *Cancer Res*, 2006. **66**(2): p. 907-14.
144. Solini, A., et al., *Increased P2X7 receptor expression and function in thyroid papillary cancer: a new potential marker of the disease?* *Endocrinology*, 2008. **149**(1): p. 389-96.
145. Baylin, S.B., et al., *Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia*. *Adv Cancer Res*, 1998. **72**: p. 141-96.
146. Costello, J.F., et al., *Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns*. *Nat Genet*, 2000. **24**(2): p. 132-8.
147. Steenbergen, R.D., et al., *TSLC1 gene silencing in cervical cancer cell lines and cervical neoplasia*. *J Natl Cancer Inst*, 2004. **96**(4): p. 294-305.
148. Feng, Q., et al., *Detection of hypermethylated genes in women with and without cervical neoplasia*. *J Natl Cancer Inst*, 2005. **97**(4): p. 273-82.
149. Sova, P., et al., *Discovery of novel methylation biomarkers in cervical carcinoma by global demethylation and microarray analysis*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006. **15**(1): p. 114-23.
150. Narayan, G., et al., *Frequent Promoter Methylation of CDH1, DAPK, RARB, and HIC1 Genes in Carcinoma of Cervix Uteri: Its Relationship to Clinical Outcome*. *Molecular Cancer*, 2003. **2**: p. 24-24.
151. Kim, J.C., et al., *Promoter methylation of specific genes is associated with the phenotype and progression of colorectal adenocarcinomas*. *Ann Surg Oncol*, 2010. **17**(7): p. 1767-76.
152. Ueki, T., et al., *Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma*. *Cancer Res*, 2000. **60**(7): p. 1835-9.
153. Garcia-Baquero, R., et al., *Methylation of tumor suppressor genes in a novel panel predicts clinical outcome in paraffin-embedded bladder tumors*. *Tumour Biol*, 2014. **35**(6): p. 5777-86.
154. Feng, Q., et al., *DNA methylation in tumor and matched normal tissues from non-small cell lung cancer patients*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008. **17**(3): p. 645-54.
155. Madan, E., et al., *p53 increases intra-cellular calcium release by transcriptional regulation of calcium channel TRPC6 in GaQ3-treated cancer cells*. *PLoS One*, 2013. **8**(8): p. e71016.
156. Kamb, A., S. Wee, and C. Lengauer, *Why is cancer drug discovery so difficult?* *Nat Rev Drug Discov*, 2007. **6**(2): p. 115-120.