



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: Efecto de la combinación Astemizol-Gefitinib y Astemizol-
Fulvestrant sobre la expresión génica y proteica del canal de potasio
Eag-1 en la línea celular de cáncer de pulmón A549.**

AUTOR: VITERI YÁNEZ, MARCO ANDRÉS

DIRECTOR: TORRES ARIAS MARBEL, Ph.D.

SANGOLQUÍ

2017



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “*Efecto de la combinación Astemizol-Gefitinib y Astemizol-Fulvestrant sobre la expresión génica y proteica del canal de potasio Eag-1 en la línea celular de cáncer de pulmón A549*” realizado por el señor VITERI YÁNEZ MARCO ANDRÉS, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas-ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar al señor VITERI YÁNEZ MARCO ANDRÉS para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 10 de agosto de 2016.

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal que sirve como línea de base para el nombre y cargo.

Torres Arias Marbel, Ph.D.

DIRECTORA



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, VITERI YÁNEZ MARCO ANDRÉS, con cédula de identidad N° 1718163759, declaro que este trabajo de titulación “*Efecto de la combinación Astemizol-Gefitinib y Astemizol-Fulvestrant sobre la expresión génica y proteica del canal de potasio Eag-1 en la línea celular de cáncer de pulmón A549*” ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas. Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, 10 de agosto de 2016.

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir 'Marco Andrés Viteri Yánez'.

Marco Andrés Viteri Yánez

C.C. 171816375-9



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, VITERI YÁNEZ MARCO ANDRÉS, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación “*Efecto de la combinación Astemizol-Gefitinib y Astemizol-Fulvestrant sobre la expresión génica y proteica del canal de potasio Eag-1 en la línea celular de cáncer de pulmón A549*” cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 10 de agosto de 2016.

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir 'Marco Andrés Viteri Yánez'.

Marcó Andrés Viteri Yánez

C.C. 171816375-9

DEDICATORIA

Dedico esta trabajo de investigación a mis padres que me dieron la vida, educación, apoyo y consejos en esta etapa universitaria.

A mi hermano quien ha sido, es y será mi amigo por siempre.

A mis profesores que nunca desistieron de encaminarme en el saber.

A mis amigos de colegio que aunque no estudiamos lo mismo, siempre estuvieron ahí para brindarme su apoyo incondicional.

A mis amigos de la universidad con quienes compartí experiencias nuevas.

A mi familia mexicana que gracias a ellos tuve una experiencia única que me hizo crecer personal y profesionalmente.

A todos los que me apoyaron para escribir y concluir este proyecto.

Marco Andrés Viteri Yáñez

AGRADECIMIENTO

Primeramente, a la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, por brindarme la oportunidad de realizar mi proyecto de titulación fuera del país gracias a su ayuda económica.

A mis padres y mi hermano, por no decir a toda mi familia, gracias por la confianza y el apoyo depositado en mí para culminar con éxitos está otra pequeña parte en el camino de la vida.

Mi gratitud al Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo, por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la valiosa oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, por confiar en mi labor y por brindarme su apoyo incondicional.

A la Dra. Marbel Torres Arias por sus valiosos aportes y dirección en el desarrollo del proyecto.

Por su puesto a cada uno de mis guías de trabajo por su ayuda, asesoría y apoyo técnico incondicional M.Sc. Elizabeth Hernández, Biol. Eunice Vera, Dra. Violeta Zuñiga y Dra. María de Guadalupe Chávez.

A mi familia mexicana Auro, Glory, Dianis, Chris, Liz y Eunice por sus palabras de aliento, momentos y experiencias compartidas. A Ale por compartir conmigo esta aventura con todos los buenos y malos momentos.

A mis amigos mexicanos que me enseñaron el valor de la amistad incondicional Chris (Garnacha), Miguel, Mel y Mike, gracias por todas las experiencias y momentos compartidos en esta nueva aventura de mi vida que ha llegado a su final.

Marco Andrés Viteri Yáñez

ÍNDICE DE CONTENIDO

CERTIFICACIÓN	I
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	II
AUTORIZACIÓN	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTO	V
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
LISTADO DE ABREVIATURAS	X
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIII
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1. ANTECEDENTES	1
1.2. JUSTIFICACIÓN	3
1.3. OBJETIVOS	5
1.3.1. Objetivo General	5
1.3.2. Objetivos Específicos	5
1.4. HIPÓTESIS	5
1.5. MARCO TEÓRICO	6
1.5.1. Cáncer: Generalidades y estadísticas	6
1.5.2. Cáncer de pulmón	9
1.5.3. Los pulmones	12
1.5.4. Mecanismos de defensa pulmonar	13
1.5.5. Etiología del cáncer de pulmón: causas y riesgos	15
1.5.6. Tratamientos para el cáncer de pulmón	16
1.5.7. Patología molecular	17
1.5.8. Tipos de cáncer de pulmón	18
1.6. CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS O NO MICROCÍTICO	19
1.6.1. Generalidades	19

1.6.2.	Modelos de carcinoma pulmonar	21
1.7.	CANALES IÓNICOS EN EL TRATAMIENTO DE CÁNCER	22
1.7.1.	Generalidades	22
1.7.2.	Canales iónicos como blancos terapéuticos.....	24
1.7.3.	Canales de potasio	24
1.7.4.	Canal Eag-1.....	26
1.8.	FÁRMACOS EN EL TRATAMIENTO DE CÁNCER.....	29
1.8.1.	Antihistamínico	29
1.8.2.	Antagonista de los receptores de estrógeno	31
1.8.3.	Inhibidor del receptor tirosina quinasa	32
1.9.	TÉCNICAS MOLECULARES	34
	CAPÍTULO II.....	37
	METODOLOGÍA	37
2.1.	PARTICIPANTES	37
2.2.	ZONA DE ESTUDIO.....	37
2.3.	PERIODO DE TIEMPO DE INVESTIGACIÓN	37
2.4.	DISEÑO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS	37
2.5.	PROCEDIMIENTO	38
2.5.1.	Antecedentes	38
2.5.2.	PCR en tiempo real	39
2.5.3.	Determinación del canal Eag-1 por inmunocitoquímica	44
2.5.4.	Análisis de datos	46
	CAPÍTULO IV	47
	DISCUSIÓN.....	47
	CAPÍTULO V.....	55
	CONCLUSIONES.....	55
	CAPÍTULO VI	56
	RECOMENDACIONES.....	56
	BIBLIOGRAFÍA.....	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mecanismos de defensa pulmonar. Factores humorales y celulares de la inmunidad innata.....	14
Tabla 2. Mecanismos de defensa pulmonar. Factores humorales y celulares de la inmunidad adaptativa.....	15
Tabla 3. Fármacos antitumorales utilizados en el tratamiento contra el cáncer de pulmón.	17
Tabla 4. Clasificación TNM del cáncer de pulmón no microcítico.	20
Tabla 5. Concentraciones inhibitorias del 20% y 50% de los fármacos.	38
Tabla 6. Tratamientos de los fármacos solos y en combinación.....	39
Tabla 7. Protocolo de preparación de DNAsa para limpiar el ARN de ADN genómico.....	40
Tabla 8. Protocolo de retrotranscripción.....	42
Tabla 9. Protocolo de PCR en tiempo real.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características del cáncer.....	7
Figura 2. Cánceres más comunes en el 2012.....	8
Figura 3. Cáncer de pulmón a nivel mundial.....	10
Figura 4. Cáncer de pulmón en Ecuador.	11
Figura 5. Posición anatómica y estructura de los pulmones en el cuerpo humano.	12
Figura 6. Cáncer de pulmón.	15
Figura 7. Células de cáncer de pulmón.	21
Figura 8. Canales iónicos. Esquema de un canal iónico en la membrana celular.	22
Figura 9. Canales iónicos.	23
Figura 10. Canales de potasio.	25
Figura 11. Funciones de los canales de potasio.....	25
Figura 12. Canal Eag-1. Estructura del canal Eag-1 y sus funciones oncogénicas.	28
Figura 13. Canal Eag-1.	29
Figura 14. Antihistamínico. Estructura química.	30
Figura 15. Antihistamínico. Mecanismo de acción sobre el canal Eag-1.	31
Figura 16. Antagonista de los receptores de estrógeno. Estructura química.	32
Figura 17. Antagonista de los receptores de estrógeno. Mecanismo de acción sobre los receptores de estrógeno (ER).....	32
Figura 18. Inhibidor del receptor tirosina quinasa. Estructura química.	33
Figura 19. Inhibidor del receptor tirosina quinasa.	34
Figura 20. PCR en tiempo real. Diseño de placa (placa de 96 pocillos).	43

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
AF	Factor activador
Akt	También llamada proteína quinasa B (PKB)
Alk	Quinasa del linfoma anaplásico
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
CaM	Sitios de unión de calmodulina
CaMKII	Calcio/CaM proteínas dependientes de cinasas II
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
cDNA	Ácido desoxiribonucleico complementario
CHO	Células de ovario de hámster chino
cNBD	Dominio de unión de nucleótidos cíclicos
CPCNP	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
CPCP	Cáncer de pulmón de células pequeñas
CYP1A1	Citocromo P450, familia 1, subfamilia A, polipéptido 1
DAB	Diaminobenzidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (ErbB-1)
ER	Receptor de Estrógenos
ERK	Quinasas reguladas por señales extracelulares
ERRC1	Proteína de reparación por escisión del grupo de complementación cruzada 1
FDA	Food and Drug Administration
GSTM	Glutación S-Transferasa Mu
HAPs	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
<i>h</i> -HPRT	Hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa de humano
HIF1	Activación del factor inducible de hipoxia 1 (HIF1),

IGF	Insulina como factor de crecimiento
KCNH1	Canal de potasio, dependiente de voltaje Eag asociado a la Subfamilia H, Miembro 1
MAPK	Quinasas de proteínas activadas por mitógenos
MET	Transición Epitelial-Mesenquimal
MMPs	Metaloproteinasas de la matriz
MTT	3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio bromuro
NES	Señales de Exportación Nuclear
NLS	Señales de Localización Nuclear
PAS	Dominio conformado por: Per (proteína del periodo circadiano), Arnt (proteína translocadora del receptor nuclear Ah) y Sim (proteína single-minded que regula el desarrollo del sistema nervioso central de <i>Drosophila</i>),
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PRC2	Complejo Polycomb 2
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
RAS	Tipo de proteína G señalizadora
RRM1	Ribonucleótido reductasa M1
RXR	Dominio de tetramerización con una señal de retención en el retículo endoplasmático
SBF	Suero Bovino Fetal
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
TKI	Inhibidor de tirosin quinasa
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VPH	Virus del Papiloma Humano

RESUMEN

El cáncer en la actualidad es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Estudios recientes sugieren a los canales iónicos como posibles marcadores tumorales, siendo el canal de potasio Eag-1 se encuentra sobreexpresado en la mayoría de cánceres. Gefitinib es un inhibidor del receptor tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico que bloquea las señales de traducción implicada en la proliferación y supervivencia de células cancerígenas. Por otra parte, Fulvestrant es un antagonista de los receptores de estrógeno, se ha visto que los receptores de estrógenos al unirse con el estradiol incrementan la transcripción de genes asociados a la proliferación en cáncer de pulmón. Además, nuevas investigaciones han demostrado el efecto antineoplásico de fármacos que se usan para otros fines, tal es el caso de astemizol, un fármaco que ha sido utilizado como un antihistamínico que, actualmente se lo está usando para inhibir al canal potasio Eag-1 al impedir el flujo de iones de potasio disminuyendo la proliferación celular tumoral. Por ende, el presente proyecto pretende evaluar el efecto de las combinaciones Astemizol-Gefitinib y Astemizol-Fulvestrant sobre la expresión génica y proteica del canal de potasio Eag-1 en la línea celular de cáncer de pulmón A549. Los diferentes tratamientos que se realizaron en la línea celular A549 mostraron que las combinaciones (Astemizol-Gefitinib, Astemizol-Fulvestrant) presentan una disminución en la expresión génica y proteica del canal de potasio Eag-1 en comparación al control, vehículo y los fármacos por separado. En conclusión, la disminución en la expresión del canal Eag-1 es un posible mecanismo molecular por el cual las combinaciones disminuyen la proliferación de las células de cáncer de pulmón.

Palabras clave:

- **CÁNCER DE PULMÓN**
- **CANAL DE POTASIO EAG-1**
- **Z (Fármaco)**
- **Y (Fármaco)**
- **X (Fármaco)**

ABSTRACT

The cancer today is one of the leading causes of death worldwide. Recent studies suggest ion channels as potential tumor markers, potassium channel being Eag-1 is overexpressed in most cancers. Gefitinib is a receptor tyrosine kinase inhibitor of epidermal growth factor receptor blocking translation signals involved in proliferation and survival of cancer cells. Moreover, Fulvestrant is an antagonist of estrogen receptors, has been that estrogen receptors by binding estradiol increase transcription of genes associated with proliferation in lung cancer. Furthermore, further investigations have shown the antineoplastic effect of drugs used for other purposes, as in the case of Astemizole, a drug that has been used as an antihistamine, currently is using to inhibit potassium channel Eag-1 to prevent the flow of potassium ions decreasing tumor cell proliferation. Therefore, this project aims to evaluate the effect of combinations Astemizole-Gefitinib and Astemizole-Fulvestrant on gene and protein expression potassium channel Eag-1 cell line A549 lung cancer. The different treatments were performed in the A549 cell line showed that combinations (Astemizole-Gefitinib, Astemizole-Fulvestrant) show a decrease in gene and protein expression potassium channel Eag-1 compared to control vehicle and drugs by separate. In conclusion, decreased expression of Eag-1 channel is a possible molecular mechanism by which combinations decrease cell proliferation of lung cancer.

Keywords:

- **LUNG CANCER**
- **POTASSIUM CHANNEL EAG-1**
- **Z (Drug)**
- **Y (Drug)**
- **X (Drug)**

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

El cáncer de pulmón es una enfermedad que se caracteriza por un crecimiento descontrolado y anormal de las células que invaden y destruyen el tejido pulmonar. Entre las principales causas se encuentra la costumbre de fumar, exposición prolongada al humo del tabaco, ciertos alimentos ahumados, la contaminación atmosférica y/o el conjunto de todas ellas, lo que aumenta la probabilidad de contraer la enfermedad (Vinaccia, y otros, 2005). Este tipo de cáncer representa la primera causa de muerte en hombres y la cuarta en mujeres, con tendencia al alza (Cebollero & Iridoy, 2015). Fue catalogado en el 2012 como el subtipo de cáncer con mayor mortalidad a escala mundial con 1.59 millones de defunciones (OMS, 2015), mientras que en las Américas la mortalidad es de 262.000 defunciones cada año y 324.000 nuevos casos (GLOBOCAN, 2012). Estuvo considerado como una enfermedad poco frecuente a mediados del siglo pasado, pero actualmente es el tumor maligno más abundante alrededor de todo el mundo (Moctezuma & Patiño, 2009).

El carcinógeno más importante para el desarrollo de este tipo de cáncer es el tabaco y existe una vinculación directa del 90% en hombre y un 85% en mujeres, siendo el riesgo para el cáncer de pulmón de 17,2 para hombres y el 11,6 para mujeres (Kajatt, 2013). De igual manera las exposiciones medioambientales de las personas al asbesto, arsénico, vinilo, uranio, cromados de níquel constituyen la segunda causa para el desarrollo del cáncer de pulmón (Eguino, Fernández, García, & García, 2005). El riesgo de morir o enfermarse por cáncer de pulmón en fumadores aumenta exponencialmente después de los 40 años de edad (Moctezuma & Patiño, 2009). En su diagnóstico histológico se distinguen dos grupos principales, el no microcítico que supone el 85% de los casos y el microcítico que constituye el 15% restante (Cebollero & Iridoy, 2015).

Los tratamientos empleados para el cáncer de pulmón tienen como objetivo alargar la supervivencia y prolongar la calidad de vida de los pacientes, sin embargo,

este tipo de cáncer es difícil de controlar con los tratamientos actuales (National Cancer Institute, Tratamiento, 2008). Al presente existen diversos tratamientos para este tipo de cáncer como lo son cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapias dirigidas e inmunoterapias; todas ellas van a aplicarse dependiendo del estadio de la enfermedad que presente el paciente. En ocasiones, cuando la enfermedad se encuentra en un estado avanzado, se realiza combinaciones de estos tratamientos para prolongar la vida o disminuir los síntomas. Sin embargo, esto no implica que la enfermedad desaparezca, ya que esta puede presentarse nuevamente (American Cancer Society, 2015).

Los fármacos que están aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés) para el tratamiento inicial en pacientes con cáncer de pulmón avanzado son: Gefitinib (Iressa®), erlotinib (Tarceva®), afatinib (Gilotrif®) (National Cancer Institute, 2015) y recientemente Opdivo (nivolumab) (FDA, 2015). Gefitinib actúa inhibiendo la enzima tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (con sus siglas en inglés, EGFR) bloqueando la transmisión de señales que participan en el crecimiento y la propagación de los tumores (ONCOWEB, 2014). Además, existen estudios en los cuales se ha observado la presencia de receptores de estrógenos (por sus siglas en inglés, ER) en este tipo de cáncer. El receptor de estrógenos β (ER β) se encuentra altamente expresado en tejido epitelial de las vías respiratorias y en la mayoría de los tipos de cáncer de pulmón, es por eso que el fármaco para disminuir la expresión de estos receptores es Fulvestrant (Faslodex®) (American Cancer Society, 2015), ya que es un medicamento que bloquea el receptor de estrógeno, y lo elimina temporalmente (Isla, y otros, 2005; Traynor, y otros, 2009).

Estos descubrimientos han generado, a nivel mundial, investigaciones para desarrollar nuevos fármacos o replantear el uso de ciertos fármacos que se usan para otras patologías. Es así, un conocido antihistamínico y prometedor fármaco antineoplásico que disminuye la proliferación de células neoplásicas bloqueando la actividad de Egr-1 (Díaz, y otros, 2012) y bloquea la producción de estrógenos suprarrenales, inhibiendo la actividad de la enzima aromatasa (Beers & Berkow, s.f.) (Enzima que se encarga de transformar a otras hormonas en estrógeno (American

Cancer Society, 2015)). Además, se sabe que Eag-1 es un canal iónico de potasio que se expresa de manera anormal en células de cáncer de pulmón (Granja, 2013).

Por ende, el presente proyecto pretende evaluar el efecto de la combinación Astemizol-Gefitinib y Astemizol-Fulvestrant sobre la expresión génica y proteica del canal de potasio Eag-1 en la línea celular de cáncer de pulmón A549, lo que permitirá aclarar el efecto que los fármacos tienen en las células neoplásicas y poder continuar con modelos *in vivo*, para a futuro llevar a cabo ensayos clínicos luego de probar su seguridad, eficacia y eficiencia.

1.2. Justificación

El cáncer es, en la actualidad, una de las principales causas de muerte a escala mundial con 14 millones de defunciones en el 2012 a 22 millones en las próximas dos décadas. Aproximadamente el 60% de los nuevos casos de cánceres se producen en África, Asia, América Central y Sudamérica; lo que representa el 70% de las muertes anuales a nivel mundial (OMS, 2015). La incidencia del cáncer, en el 2012, fue de 454,8 por 100.000 hombres y mujeres, mientras que la mortalidad es de 171,2 por 100.000 hombres y mujeres; siendo el número de muertes más alta en hombres que en mujeres, pero con tendencia al aumento en estas últimas. Para este mismo año se mencionó que cerca del 39,6% de hombres y mujeres recibirán un diagnóstico de cáncer en algún momento de sus vidas. En el 2014, aproximadamente 15.780 niños y adolescentes recibieron diagnósticos de cáncer y 1960 murieron por tal enfermedad (National Cancer Institute, s.f.). Además, se sabe que la incidencia y mortalidad de cáncer en regiones desarrolladas es más que las regiones en vías de desarrollo ya que representa la segunda causa principal de mortalidad luego de las enfermedades cardiovasculares, aunque datos epidemiológicos muestran un aumento en la tendencia en regiones menos desarrolladas (OMS, 2008). Estos datos recolectados suponen un aumento en los gastos mundiales por parte de los gobiernos, comunidades e industrias privadas que se dedicarán a la atención del cáncer para el desarrollo de nuevos fármacos o tratamientos que mejoren la calidad de vida de la población. En América, en el 2009, hubo 2,8 millones de nuevos casos de cáncer y sus costos (diagnóstico, tratamiento, etc.) se valoraron en \$153 mil millones de dólares; siendo el más costoso el cáncer de pulmón con un costo anual de \$31.000

millones de dólares. Se estima que en los próximos diez años los costos de cáncer aumentarán en un 30% (Organización Panamericana de la Salud). En el 2013, la OMS puso en marcha el Plan de Acción Global para la Prevención y el Control de las Enfermedades No Transmisibles 2013-2020, el cual tiene como objetivo reducir la muerte prematura en un 25% de cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes y enfermedades respiratorias; así como también disminuir el consumo de tabaco en un 30% en la próxima década (OMS, 2015).

En el 2012 el cáncer con mayor mortalidad fue el de cáncer de pulmón, seguido del cáncer hepático, gástrico, colorrectal, mamario y de esófago (OMS, 2015). El cáncer de pulmón es el tercer tipo de cáncer más habitual y la primera causa de muerte relacionada con cáncer en las Américas. De acuerdo con proyecciones estadísticas en el 2030, existirán 514.000 de nuevos casos y 445.000 muertes por cáncer de pulmón. El hábito de fumar es el mayor factor de riesgo para contraer cáncer de pulmón. El riesgo aumenta con cada tabaco y el número de años que se fuma ya que aproximadamente un 84% de las muertes por cáncer de pulmón son atribuibles al tabaquismo (GLOBOCAN, 2012), mientras que si se deja de fumar el riesgo disminuye. Se ha visto que las personas que están expuestas al humo de tabaco el riesgo aumenta para contraer cáncer. La exposición a asbestos y otros químicos como arsénico, cromo y níquel aumenta considerablemente el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón si además se fuma. El radón, el excesivo alcohol y un historial familiar de cáncer de pulmón también incrementan el riesgo de contraer cáncer (IASLC, 2015).

En Ecuador el cáncer de pulmón es una enfermedad que ataca tanto a hombres como a mujeres encontrándose en cuarto y sexto lugar de mortalidad, respectivamente (Salvador, 2014). En la actualidad los adolescentes son los principales consumidores de tabaco, lo que llevará al aumento de cáncer de pulmón en los próximos años. Según el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC) los egresos hospitalarios en el 2011 dieron a conocer que la mayoría de tumores malignos están presentes en los órganos respiratorios e intratorácicos siendo en los hombres en un 4,7% y en mujeres el 1,3% (INEC, 2011).

Las terapias que existen en la actualidad ayudan a prolongar y mejorar la calidad de vida de las personas, siendo las más utilizadas la cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapias dirigidas y últimamente inmunoterapias. Las terapias dirigidas para cáncer involucran fármacos u otras sustancias que disminuyen el crecimiento y la diseminación del mismo. Siguiendo esta investigación, el presente proyecto permitirá evaluar efecto de la combinación Astemizol-Gefitinib y Astemizol-Fulvestrant sobre la expresión génica y proteica del canal de potasio Eag-1 en la línea celular de cáncer de pulmón A549, debido a que estos fármacos han sido aprobados por la FDA para estadios avanzados de cáncer de pulmón a excepción de astemizol, que funciona como un antihistamínico y se encuentra en estudio como un fármaco antineoplásico (National Cancer Institute, 2014; National Cancer Institute, 2015; Isla, y otros, 2005).

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

- Determinar el efecto de la combinación astemizol-gefitinib y astemizol-fulvestrant sobre la expresión génica y proteica del canal de potasio Eag-1 en la línea celular de cáncer de pulmón A549.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Determinar el efecto de astemizol, gefitinib, fulvestrant y sus combinaciones (Astemizol-Gefitinib y Astemizol-Fulvestrant) en la línea celular de cáncer de pulmón A549 sobre la expresión génica mediante qRT-PCR del canal de potasio Eag1.
- Determinar el efecto de astemizol, gefitinib, fulvestrant y sus combinaciones (Astemizol-Gefitinib y Astemizol-Fulvestrant) en la línea celular de cáncer de pulmón A549 sobre la expresión proteica mediante inmunocitoquímica del canal de potasio Eag1.

1.4. Hipótesis

La combinación de los fármacos astemizol-gefitinib y astemizol-fulvestrant disminuyen la expresión génica y proteica del canal de potasio Eag-1 en la línea celular de cáncer de pulmón A549, en mayor grado que los fármacos por separado.

1.5. Marco teórico

1.5.1. Cáncer: Generalidades y estadísticas

El cáncer es un nombre que se da a un amplio grupo de enfermedades que se caracteriza por un crecimiento descontrolado de células anormales con una gran capacidad de invasión y destrucción de tejidos. Es una enfermedad genética, es decir que se debe a cambios en los genes que controlan el desarrollo y funciones de las células. Estos cambios genéticos pueden deberse a alteraciones en el ADN, ya que en células normales una alteración de ADN es reparada y si no es así la célula muere, mientras que en células cancerosas la alteración en el ADN no se repara y tampoco mueren (American Cancer Society, 2016). Normalmente, las células normales del cuerpo envejecen, mueren y son reemplazadas por células nuevas. Sin embargo, en el cáncer este proceso es descontrolado, ya que las células anormales se dividen y sobreviven en vez de morir, lo que pueden formar masas llamadas tumores. La mayoría de los cánceres forman tumores sólidos que son masas de tejido que pueden ser malignos y benignos. Además, como se puede observar en la Figura 1, el cáncer presenta varias características entre las cuales puede influir a células normales a que ayuden en el desarrollo del tumor por medio de la inducción a la angiogénesis, evasión del sistema inmunitario y genes supresores de crecimiento, activación de la invasión y metástasis, proliferación celular indefinida, entre otras. (American Cancer Society, 2011; Instituto Nacional del Cáncer, 2015; Hanahan & Weinberg, 2013).



Figura 1. Características del cáncer. El cáncer presenta varias características que permiten su existencia, entre las cuales se encuentran: mutación genética e inmortalidad, evasión a la apoptosis, sistema inmune y supresores de crecimiento, inducción a la angiogénesis, tumores, invasividad y metástasis.

Fuente: (Hanahan & Weinberg, 2013)

La etiología de esta enfermedad es muy variada ya que depende de factores externos, como la exposición a carcinógenos, físicos (radiación ultravioleta e ionizantes), químicos (asbestos, aflatoxinas, arsénico), biológicos (virus, bacterias, hongos, parásitos) y otros (factores alimenticios, inmunosupresión); además de factores intrínsecos del individuo como la edad, sexo, etnia, hormonas, susceptibilidad genética e inmunidad (OMS, 2015; Hill, 2014; Thomas, 2005).

Para contrarrestar el cáncer, existen diversos tipos de tratamiento según el tipo y estadio de desarrollo del mismo entre los cuales se puede mencionar la cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia dirigida, terapia hormonal y trasplante de células madre; la mayoría de personas enfermas reciben una combinación de estos tratamientos para disminuir el cáncer (Instituto Nacional del Cáncer, 2015).

El 2012 encontraron 14.1 millones de casos nuevos de cáncer diagnosticado, 8 millones de personas murieron a causa de esta enfermedad y 32.6 millones de personas han llegado a los 5 años después de su diagnóstico de cáncer. Se pronostica que para el 2025 se diagnosticarán 19.3 millones de nuevos casos de cáncer anualmente. En los países de bajos y medianos ingresos se registraron 8 millones de casos diagnosticados, 5.3 millones de defunciones por cáncer y 15.6 millones de

personas que han llegado a los 5 años luego de su diagnóstico (CDC, 2015). El 30% de todas las muertes se deben a factores alimenticios y de comportamiento (índice de masa corporal, consumo de tabaco y alcohol, falta de actividad física y una mala alimentación), factores que se pueden prevenir (OMS, 2015).

En el 2012, los cánceres más diagnosticados en el mundo se muestran en la Figura 2; pero su prevalencia dependiendo del sexo fue para hombres: Cáncer de Pulmón, próstata, estómago, hígado y colorrectal, mientras que en mujeres: Cáncer de Mama, pulmón, cuello uterino, estómago y colorrectal (GLOBOCAN, 2012).

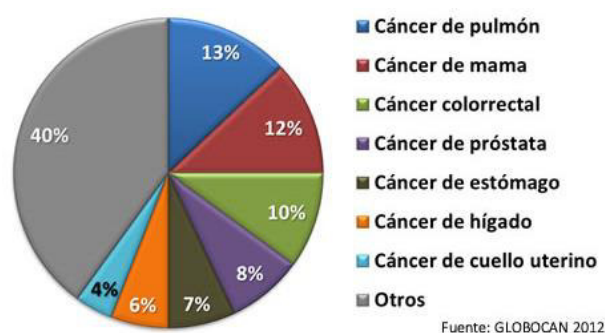


Figura 2. Cánceres más comunes en el 2012. El cáncer de pulmón se encuentra en primer lugar provocando un mayor número de nuevos casos y muertes.

Fuente: (GLOBOCAN, 2012)

En las últimas dos décadas se han generado nuevos avances en investigación sobre el cáncer con lo que se han desarrollado distintos tratamientos como inmunoterapia, genética del cáncer, nanotecnología, cirugía robótica, perfiles de expresión génica, inhibidores de transducción de señales, inductores de apoptosis, inhibidores de angiogénesis, anticuerpos monoclonales y proteómica, los que ayudarán a disminuir el cáncer. (American Cancer Society, 2014; National Cancer Institute, 2014).

Los costos globales para el diagnóstico de cáncer son altos y aún más dependiendo del tipo de cáncer, ya que se incluyen gastos médicos (citas, diagnóstico, tratamiento, medicamentos) y no médicos (transporte, gastos familiares, cuidados) (Cancer.Net, 2015). El costo de atención de cáncer en el 2010 fue de \$157 mil millones de dólares, gracias a los costos que aporta el gobierno y entidades privadas habrá 18,1 millones de sobrevivientes de cáncer en 2020, 30% más que en

2010. El crecimiento y el envejecimiento de la población es la principal causa (National Cancer Institute, 2011).

1.5.2. Cáncer de pulmón

1.5.2.1. Estadísticas mundiales

El cáncer de pulmón es uno de los cánceres más comunes desde hace varias décadas. Es el cáncer más frecuente mundialmente en ambos sexos seguido de seno, colon y recto, estómago e hígado. En hombres, el cáncer de pulmón ocupa el primer lugar seguido de próstata, colon y recto, estómago, e hígado. Mientras que en mujeres encabeza el cáncer de mama seguido de colon y recto, cuello uterino, pulmón, y estómago; aunque la incidencia y mortalidad de cáncer de pulmón, en mujeres, está en aumento (Alonso, 2008).

En 2012 se registró 1.8 millones de nuevos casos, del cual el 58% se produjo en países en vías de desarrollo. Este tipo de cáncer sigue siendo el más común entre los hombres, mientras que en mujeres su tasa de incidencia es menor. El cáncer de pulmón es la causa más común de muerte por cáncer en el mundo, se estima que es responsable de casi una de cada cinco (1,59 millones de muertes), ya que la relación global de la mortalidad a la incidencia es de 0,87. En la Figura 3 se puede observar el porcentaje de nuevos casos y defunciones por cáncer de pulmón alrededor del mundo en el 2012 (GLOBOCAN, 2012).

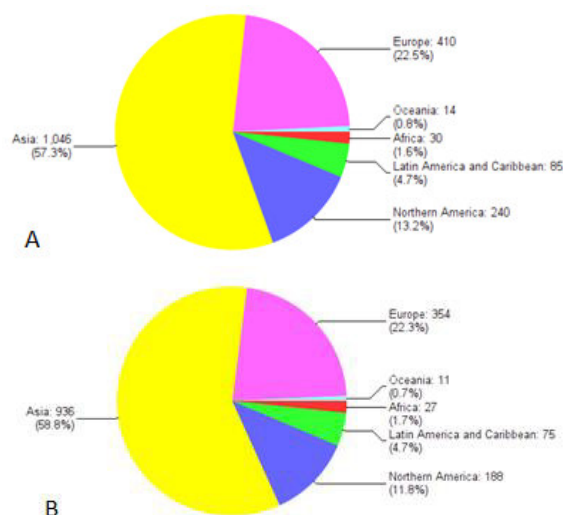


Figura 3. Cáncer de pulmón a nivel mundial. A. Número aproximado de nuevos casos en el 2012.

B. Número aproximado de defunciones en el 2012.

Fuente: (GLOBOCAN, 2012).

El cáncer de pulmón es responsable de aproximadamente el 27% de todas las muertes por cáncer. El mayor factor de riesgo para el desarrollo de este tipo de cáncer es el tabaquismo, por sí solo provoca 22% de las muertes mundiales y el 71% de muertes por cáncer de pulmón. Este cáncer ocurre principalmente en personas de edad avanzada, dos de tres personas mayores de 65 años lo padecen; mientras que menos del 2% ocurren en personas menores de 45 años (OMS, 2015; American Cancer Society, 2015)

Las estadísticas sobre la supervivencia en personas con cáncer de pulmón dependen de la extensión o etapa en la que se encuentra el paciente al momento del diagnóstico. Aunque el pronóstico es grave, pacientes con diagnósticos en etapas tempranas son curados. Alrededor de 430 000 personas han sido diagnosticadas con cáncer de pulmón en algún momento de su vida (American Cancer Society, 2015).

1.5.2.2. Cáncer de pulmón en Ecuador

En Ecuador, en el año 2012, según el Registro Nacional de Tumores de SOLCA Núcleo de Quito, se produjeron 753 defunciones por Cáncer de Pulmón, 432 casos en hombres y 321 en mujeres. Luego del cáncer de estómago y próstata, el cáncer de pulmón se encuentra como la tercera causa de muerte como se muestra en

la Figura 4 con un 7.6% de la población ecuatoriana. A nivel mundial la tendencia de este tipo de cáncer ha disminuido debido a campañas de prevención. En Ecuador ocurre un fenómeno similar en hombres, pero en mujeres se encuentra en ascenso (Cueva, Delgado, & Muñoz, 2014).

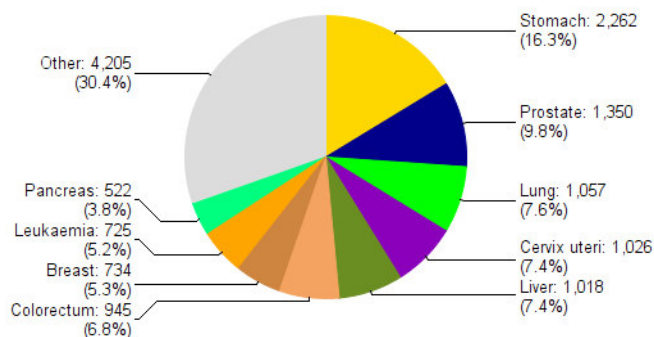


Figura 4. Cáncer de pulmón en Ecuador. En Ecuador el cáncer de pulmón se encuentra como la tercera causa de muertes con un 7.6% de la población.

Fuente: (GLOBOCAN, 2012).

Estudios epidemiológicos realizados en la ciudad de Guayaquil demuestran que este tipo de cáncer fue, en el 2006, la cuarta causa de muerte en hombres, con 396 defunciones lo que representa el 10% del total de muertes por cáncer en el país. Además, en el periodo 1990-2006 presenta una frecuencia de 3.4%. En hombres ocupó el cuarto lugar con 5.7% y en mujeres el onceavo con un 2% (Tanca & Arreaga, 2010).

Sin embargo, en la ciudad de Quito, en el periodo 1986-2010 existió una disminución en hombres y un aumento en mujeres. En el 2014, hubo 7.9 hombres y 6 mujeres por cada 100 mil habitantes con cáncer de pulmón y se observó que existe una relación inversa entre el nivel de instrucción y la incidencia del cáncer de pulmón; siendo el tipo histológico más frecuente el adenocarcinoma. En hombres, este tipo de cáncer sigue presentándose en cuarto, mientras que en mujeres subió al sexto puesto a nivel nacional (Salvador, 2014; Cueva, Delgado, & Muñoz, 2014).

A nivel mundial el cáncer de pulmón es el más común, ya que presenta incidencias muy altas de 53.5 de casos por cada 100.000 habitantes. Sin embargo, en Ecuador es mucho mejor, 5.99 por cada 100.000 habitantes. Además, según la OPS,

Ecuador se encuentra entre los países con mayor prevalencia de consumo de tabaco en adolescentes (Salud, 2015; OPS, 2014).

1.5.3. Los pulmones

Los pulmones son dos órganos esponjosos, ligeros, blandos, elásticos y de aspecto cónico, que se encargan de la respiración, pudiendo reducirse a la tercera parte de su tamaño original, localizados en la caja torácica y contenidos dentro de un saco pleural, conformando parte del aparato respiratorio. En la Figura 5 se observa la posición anatómica y estructuras de los pulmones en humanos. El pulmón derecho es de mayor peso y está dividido en tres lóbulos, mientras que el izquierdo es más liviano y presenta dos lóbulos; ambos se encuentran separados por el mediastino, área que contiene al corazón, tráquea, esófago. El hilio de cada pulmón es la estructura que permite el ingreso y salida de arterias, venas, bronquios, nervios, vasos y ganglios linfáticos (Instituto Nacional del Cáncer, 2015).

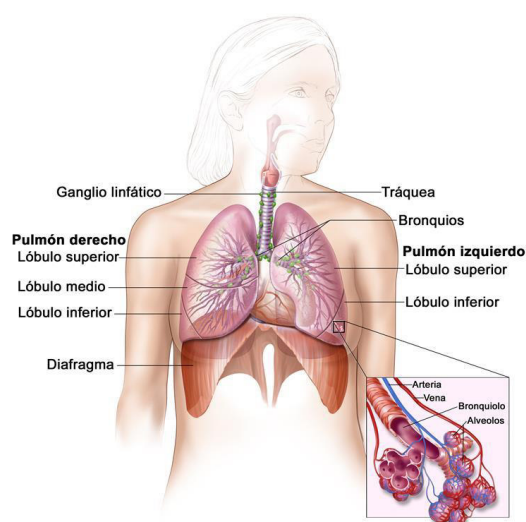


Figura 5. Posición anatómica y estructura de los pulmones en el cuerpo humano.

Fuente: (Instituto Nacional del Cáncer, 2015).

Su misión es capturar el oxígeno del exterior e incorporarlo a la sangre y eliminar el dióxido de carbono producido como desecho de las células. El aire llega a los pulmones por medio de los bronquios (estructura en forma de un árbol invertido). La estructura principal es la tráquea ya que une la nariz y la boca con los dos pulmones, a su vez se divide en dos bronquios, derecho e izquierdo. De aquí nacen

los bronquios lobares, tres para el derecho y dos para el pulmón izquierdo. Estos vuelven a dividirse en bronquios segmentarios, y a su vez en otros de menor tamaño llamados bronquiolos y finalmente en la última estructura pulmonar con la capacidad de permitir el intercambio de oxígeno y dióxido de carbono, los alveolos que son estructuras esféricas (Eguino, Fernández, García, & García, 2005).

1.5.4. Mecanismos de defensa pulmonar

Los mecanismos de defensa que presenta el aparato respiratorio son muy variados, entre ellos encontramos las barreras anatómicas, la tos y el aparato mucociliar; sin embargo, los patógenos o partículas nocivas superan estos elementos. La defensa del árbol respiratorio se basa en una serie de factores humorales y celulares que componen el sistema inmunitario innato y adaptativo trabajando en la eliminación de elementos exógenos (Jiménez, Zúñiga, & Ramírez, 2009).

La inmunidad innata es la primera línea de defensa frente a patógenos, luego de las barreras anatómicas, y su función es mantener la vía aérea estéril. La conforman los mecanismos de defensa específicos y no-específicos que se activan para combatir elementos biológicos extraños. Dentro de estos encontramos los factores humorales que son diversas moléculas con actividad bactericida y propiedades antivirales, y los factores celulares que está constituido por grupos de células con capacidad fagocítica, citocida y células que participan en la inflamación y presentadoras de antígenos (García & Sibila, 2013). En la Tabla 1 se puede apreciar las células de la inmunidad innata.

Tabla 1.

Mecanismos de defensa pulmonar. Factores humorales y celulares de la inmunidad innata.

Inmunidad innata			
Factores humorales	Descripción	Factores celulares	Descripción
Mucinas	Son proteínas glicosiladas, que funcionan como receptores de superficie celular para patógenos y activar vías de señalización intracelular.	Células ciliadas	Eliminan a los patógenos mediante movimientos de sus cilios, el reconocimiento de estructuras patógenas se debe a los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) y los toll-like receptor (TLR).
Péptidos antimicrobianos	Son moléculas catiónicas con regiones hidrófobas y regiones cargadas positivamente, los que les confiere una acción antimicrobiana.	Células fagocíticas	Como los neutrófilos, eosinófilos polimorfonucleares y los monocitos que fagocitas cualquier partícula biológica o no.
Lactoferrina	Es una proteína ligada al hierro, es secretada por los neutrófilos y las células epiteliales, priva a los patógenos de este elemento esencial para su supervivencia.	Células Natural Killer (NK)	Con linfocitos que presentan gránulos azurófilos en el citoplasma, reconocen a gran variedad de células tumorales y células infectadas por virus, y las destruyen mediante la liberación del contenido de sus gránulos (citotoxicidad espontánea).
Lisozima	Proteína producida por el epitelio respiratorio y los neutrófilos, presenta actividad antimicrobiana frente a patógenos gram negativos y gram positivos.	Basófilos/mastocitos	Son un tipo de granulocitos circulares, que expresan un receptor para inmunoglobulina E (IgE), lo que constituye un receptor de agentes biológicos extraños.
Colectinas	Son proteínas de la familia de la lecitina, induce la fagocitosis de las bacterias gram negativas por los macrófagos alveolares.	Células dendríticas	Son células presentadoras de antígeno, fagocitan estructuras microbianas, partículas inhaladas y cuerpos apoptóticos de células epiteliales infectadas por virus.
		Macrófagos alveolares	Son células especializadas que desempeñan un papel fundamental en procesos como homeostasis, remodelamiento tisular, respuesta a agentes externos (orgánicos o no) y a patógenos.

Fuente: (García & Sibila, 2013)

La inmunidad adaptativa es el conjunto de sistemas de defensa específica frente a determinados agentes biológicos externos. Estos sistemas son adquiridos, no congénitos, y evolucionados por un contacto previo con el agente nocivo. Su principal característica es su especificidad y su memoria frente al agente nocivo. De igual manera que la inmunidad innata, existen factores humorales que son anticuerpos específicos o inmunoglobulinas que neutralizan a los agentes biológicos patógenos, y los factores celulares que está constituido por linfocitos B y linfocitos T

(García & Sibila, 2013). En la Tabla 2 se presenta los factores humorales y celulares de la inmunidad adaptativa.

Tabla 2.

Mecanismos de defensa pulmonar. Factores humorales y celulares de la inmunidad adaptativa.

Inmunidad adaptativa		
Factores humorales	Descripción	Factores celulares
Inmunoglobulina G (IgG)	Es la predominante en el aparato respiratorio y tienen la mayor actividad de opsonización en los alvéolos.	Constituido por los linfocitos B y los linfocitos T. Los linfocitos B producen anticuerpos que están involucrados en la respuesta inmune. Los linfocitos T CD4+ y CD8+ reaccionan con los distintos epítopes antigénicos.
Inmunoglobulina A secretora (IgA)	Es liberada por las células epiteliales, neutraliza toxinas, virus y bacterias que llegan e intentan penetrar la superficie mucosa y pasar al tejido.	

Fuente: (García & Sibila, 2013)

1.5.5. Etiología del cáncer de pulmón: causas y riesgos

El cáncer del pulmón se origina en estructuras del árbol respiratorio pudiendo ser en la tráquea, los bronquios, los bronquiolos o los alvéolos, como se observa en la Figura 6 (Eguino, Fernández, García, & García, 2005). El riesgo de contraer este tipo de cáncer o morir aumenta drásticamente en fumadores mayores de 40 años, ya que la tasa de mortalidad está relacionada directamente con el consumo de tabaco. Personas que han dejado de fumar, luego de 10 años, el riesgo disminuye en un 50% comparado con el hábito (Moctezuma & Patiño, 2009).

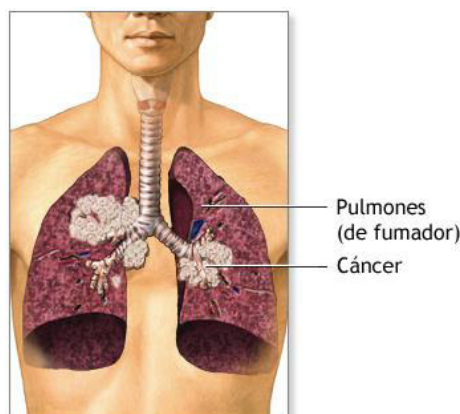


Figura 6. Cáncer de pulmón. El cáncer de pulmón se origina en las estructuras del árbol respiratorio.

Fuente: (USC, 2015).

El carcinógeno más importante para el cáncer de pulmón es el tabaco, ya que provoca cerca del 90% en hombres y el 85% en mujeres. El humo de tabaco contiene un gran número de compuestos que son catalogados como cancerígenos, entre los más nombrados se encuentran las nitrosaminas, los benzopirenos y radioisótopos de radón. También se ha vinculado el humo de la leña doméstica ya que presenta partículas nocivas como fenoles, acroleína, cresoles, acetaldehído, benceno, formaldehído, butadieno e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs). Otros factores a tomar en consideración para este cáncer son los aspectos genéticos, historial de cáncer en la familia, ciertos suplementos alimenticios, contaminación ambiental, uranio, vinilo, cromados de níquel, pesticida, asbestos, arsénico y el virus del papiloma humano (Eguino, Fernández, García, & García, 2005; Kajatt, 2013).

1.5.6. Tratamientos para el cáncer de pulmón

El tratamiento del cáncer de pulmón depende de varios factores como el tipo de cáncer de pulmón, el tamaño, sitio, extensión del tumor y la salud en general del paciente. Actualmente, los principales métodos utilizados son la cirugía, radioterapia y la quimioterapia. La cirugía es el método más empleado para tumores pequeños y localizados en lugares específicos, que consiste en retirar todas las células cancerígenas y parte del tejido que rodea al tumor para que sea completamente eficaz. La radioterapia es un método en el cual se emplea radiaciones ionizantes para eliminar células cancerígenas, actuando sobre el tumor impidiendo que crezca y se reproduzca. La quimioterapia es el uso de fármacos para destruir a las células cancerígenas con el fin de impedir su reproducción; su mecanismo de acción es inducir alteración celular ya sea en la síntesis de ácidos nucleicos, división celular o síntesis de proteínas (Espinoza, 2011; Cancer.Net, 2015). En la Tabla 3 se puede observar los fármacos antitumorales utilizados en diferentes cánceres.

Tabla 3.

Fármacos antitumorales utilizados en el tratamiento contra diversos tipos de cáncer.

Compuesto	Mecanismo de acción
Cisplatino	Daño al ADN, generación de radicales libres con activación de p53, síntesis de Bax y activación del sistema receptor/ligando CD95.
Carboplatino Oxalplatino	Daño al ADN y unión a proteínas plasmáticas, con mecanismo similar al cisplatino.
Paclitaxel	Inhibidor mitótico, previene despolimerización microtubular.
Ciclofosfamida	Citotóxico por daño al ADN.

Fuente: (Espinoza, 2011)

1.5.7. Patología molecular

El riesgo individual para contraer cáncer de pulmón puede estar determinado con alteraciones congénitas en los genes que codifican proteínas para el metabolismo de carcinógenos. En la actualidad, los más estudiados son el Citocromo P450, familia 1, subfamilia A, polipéptido 1 (CYP1A1) y Glutación S-Transferasa Mu (GSTM). CYP1A1 es un miembro del sistema enzimático de los Citocromos P540 que permite la unión de los carcinógenos al ADN, lo que resulta alterado. Por otro lado, GSTM es una forma activa del sistema enzimático Glutación-S que ejerce inactivación a los carcinógenos. Si un individuo presenta polimorfismos en los genes que codifican estas proteínas, presenta alto riesgo de adquirir la enfermedad (Piñeiro, 2003).

La alteración genética más frecuente para el cáncer de pulmón es la mutación en el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (por sus siglas en inglés, EGFR) también llamado como ErbB-1, que cuando se activan codifican proteínas a las que se las llama factores de crecimiento celular. El ErbB-1 permite a los tumores ser independientes de las señales de supervivencia que son traducidas por otros genes. Se expresa en la mayoría de los carcinomas no microcíticos de pulmón y está asociado a un mal pronóstico. Así mismo, se ha identificado un receptor estrogénico β en el cáncer de pulmón y se sugiere como un marcador debido a que tiene participación biológica en la tumorogénesis. El gen supresor de tumores p53 se observa hasta en el 77% de los carcinomas no microcíticos de pulmón y el 49% de los microcíticos. Finalmente, los marcadores moleculares que actualmente están en desarrollo son el EGFR, gen K-ras, proteína de reparación por escisión del grupo de complementación cruzada 1 (ERRC1), ribonucleótido reductasa M1 (RRM1), factor

de crecimiento endotelial vascular (VEGF), quinasa del linfoma anaplásico (Alk), la Transición Epitelial-Mesenquimal (MET), sobreexpresión de ciclina D1 y proteínas importantes en el potencial de membrana celular como los canales de sodio, cloro y fundamentalmente de potasio. (Piñeiro, 2003; Kajatt, 2013 ; Alonso, Cabezón, Sáez, & Lara, 2004 ; Alonso, 2008; Espinoza, 2011).

1.5.8. Tipos de cáncer de pulmón

Existen dos tipos de cáncer de pulmón dependiendo del tipo de células, así tenemos el cáncer de células no pequeñas o no microcítico y cáncer de células pequeñas o microcítico.

- **Cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) o no microcítico**

Es el tipo más común de cáncer de pulmón con el 85-90% de todos los casos. A su vez, presenta tres subtipos de CPCNP que dependen del tamaño, la forma y composición química cuando son vistas al microscopio. Entre ellos tenemos: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células grandes (American Cancer Society, 2016; Instituto Nacional del Cáncer, 2015).

- **Cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) o microcítico**

Cerca del 10-15% de los cánceres son de este tipo. Es muy raro que personas que no hayan fumado tengan este cáncer. Comienza en los bronquios cerca del centro del pecho, tiende a crecer y propagarse rápidamente, y la mayoría de las veces se extiende a partes distantes del cuerpo antes de que se lo localice. Dependiendo de las clases de células y la apariencia se las clasifica en: carcinoma de células pequeñas y carcinoma combinado de células pequeñas (American Cancer Society, 2016; Instituto Nacional del Cáncer, 2015).

1.6. Cáncer de pulmón de células no pequeñas o no microcítico

1.6.1. Generalidades

Este cáncer es el más abundante en todo el mundo ya que aproximadamente el 85-90% de los cánceres son de este tipo. Puede surgir en cualquier parte del tejido que reviste las vías aéreas del pulmón. Una de sus características es que se disemina con lentitud, lo que hace que se lo pueda tratar. Sin embargo, el consumo de tabaco activo constituye un factor de riesgo establecido y caracterizado. La causa de este cáncer es multifactorial, y otros factores pueden contribuir a la aparición de forma sinérgica (American Cancer Society, 2016; Lung Cancer Alliance, 2016).

Existen tres subtipos que depende de las particularidades que posea la célula cancerosa, teniendo así (Lungcancer, 2016):

- **Adenocarcinoma:** cerca del 40% de los cánceres de pulmón son adenocarcinoma. Se desarrolla en las células que recubren los alvéolos. Puede extenderse sin destruir otros tejidos. Ocurre principalmente en fumadores y también se ha visto en no fumadores, es más común en mujeres que en hombres. Además, se ha visto que sucede más en personas jóvenes.
- **Carcinoma de células escamosas:** se origina en las células escamosas, llamado también carcinoma epidermoide. Ocurre en las células delgadas y planas que recubren los conductos de las vías respiratorias. Representa el 25-30% de los cánceres de pulmón diagnosticados.
- **Carcinomas de células grandes:** constituye el 10-15% de los cánceres de pulmón. Crece en cualquier parte del pulmón y se expande rápidamente lo que hace que sea difícil de tratar.

Por otra parte, el sistema utilizado internacionalmente para clasificar el cáncer de pulmón es el TNM, que considera la clasificación por estadios clínicos (clasificación que se muestran en la Tabla 4 con sus características).

Tabla 4.

Clasificación TNM del cáncer de pulmón no microcítico.

Tumor primario				
Tx	Tumor primario que no puede ser evaluado			
T0	No hay presencia de tumor primario.			
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> .			
T1	Tumor con un diámetro no mayor a 3 cm rodeado por tejido pulmonar o pleural visceral, sin evidencia de invasión proximal al bronquio principal en la fibrobroncoscopía.			
T2	Tumor con un diámetro mayor a 3 cm, pero menor a 7 cm, o tumor con cualquiera de las siguientes características: invade la pleura visceral o que está asociado con atelectasia o neumonitis obstructiva pero no afectan al pulmón entero.			
T3	Tumor con un diámetro mayor a 7 cm o de cualquier tamaño que invade directamente la pared torácica, diafragma; o asociado a atelectasia o neumonitis obstructiva del pulmón entero; o existencia nódulo(s) en el mismo lóbulo.			
T4	Tumor de cualquier tamaño con invasión en: corazón, tráquea, esófago, cuerpo vertebral.			
Ganglios linfáticos regionales				
Nx	Ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados.			
N0	Sin ganglios linfáticos regionales comprometidos.			
N1	Metástasis ganglionares peribronquiales homolaterales y/o hiliares homolaterales.			
N2	Metástasis ganglionares mediastínicas homolaterales y/o subcarinales			
N3	Metástasis ganglionares mediastínicas contralaterales, hiliares contralaterales, escalénicas ipsilaterales y contralaterales o supraclaviculares.			
Metástasis a distancia				
M0	Ausencia de metástasis a distancia.			
M1	Existencia de metástasis a distancia			
Agrupación por estadios del cáncer de pulmón				
		T	N	M
Carcinoma oculto		Tx	N0	M0
Estadio 0		Tis	N0	M0
Estadio I	IA	T1	N0	M0
	IB	T2	N0	M0
Estadio II	IIA	T1	N1	M0
		T2	N1, N0	M0
	IIB	T2	N1	M0
		T3	N0	M0
Estadio III	IIIA	T1, T2	N2	M0
		T3	N1, N2	M0
	IIIB	T4	N0, N1	M0
		T4	N2	M0
Estadio IV		Cualquier T	N3	M0
Estadio IV		Cualquier T	Cualquier N	M1

Fuente: (González, y otros, 2012)

1.6.2. Modelos de carcinoma pulmonar

Existen un gran número de modelos *in vitro* que se han utilizado para realizar investigaciones en cáncer de pulmón, entre ellos tenemos a las líneas celulares A427, A549, Calu-1, Calu-3, Calu-6, H23, H226, H358, H441, H460, H520, H522, H596, H1975, H2023, H2030, H2073, H2106, H2110, H2122, H2126, H2135, H2172, H2228, H2286, H2291, H2342, H2405, H2444, HCC827, SHP77, SK-LU-1, entre otras. La línea celular A549 son células alveolares epiteliales basales de carcinoma pulmonar, cuya visualización al microscopio se observa en la Figura 7. En un pulmón normal, este tipo de células son escamosas y responsables de la difusión de sustancias como agua, electrolitos, etc., a través de la superficie de los alvéolos del pulmón (ATCC, 2014; Probiotek, 2016).

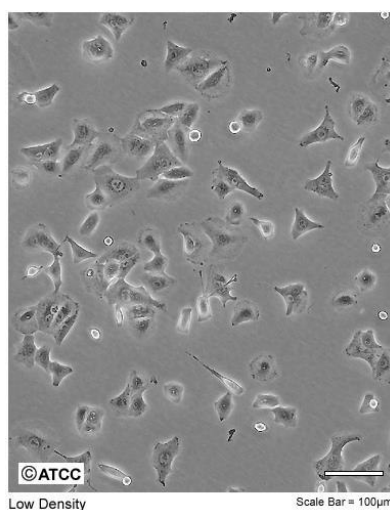


Figura 7. Células de cáncer de pulmón. Vista de A549 al microscopio con una baja confluencia.

Fuente: (ATCC, 2014).

Se han realizado un sinnúmero de investigaciones sobre esta línea celular con el fin de encontrar una respuesta contra el cáncer de pulmón, puesto que presenta resistencia a fármacos específicos, dificultando su tratamiento y aumentando la incidencia y mortalidad en la población. Actualmente se está indagando en la parte molecular, especialmente en canales iónicos, ya que estudios demuestran que existe una sobreexpresión en ciertos tipos de cáncer, y poder así, diseñar un tratamiento más específico que presente gran capacidad de disminuir esta enfermedad. Investigaciones actuales han demostrado que la línea celular A549 expresa un canal

iónico de potasio (Eag-1) y un receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), moléculas que se encuentran en estudio debido a su relación con el desarrollo de cáncer. De igual manera se ha visto que la combinación de fármacos ayuda a contrarrestar diferentes tipos de cáncer. (García, Rodríguez, & Scull, 2011; Hsu, Kuo, & Lin, 2004; Chou, y otros, 2003; Nguyen, y otros, 2004).

1.7. Canales iónicos en el tratamiento de cáncer

1.7.1. Generalidades

Los canales iónicos son proteínas que atraviesan la membrana de las células permitiendo el paso de iones inorgánicos a favor de un gradiente de potencial. La fuerza que impulsa los iones a través de un canal iónico es una combinación del potencial transmembrana eléctrico y del gradiente de concentración de iones a través de la membrana, la combinación de estos dos efectos se conoce como gradiente electroquímico. Son pasivos (no requiere una fuente de energía para funcionar) y se encuentran formados por regiones hidrofóbicas que están en contacto a las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos de la membrana, y por regiones hidrofílicas que se encuentran encerradas en el interior de la membrana celular interactuando con los iones, permitiendo así el paso a través de la membrana. Las regiones hidrofílicas conforman lo que se conoce como el poro del canal. En la Figura 8 se observa el esquema de un canal iónico anteriormente descrito. (Cohen & Khalili, 2013).

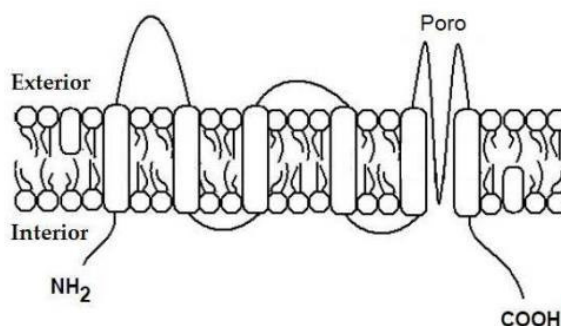


Figura 8. Canales iónicos. Esquema de un canal iónico en la membrana celular.

Fuente: (Universidad de Buenos Aires, 2014)

Los canales iónicos presentan tres funciones fundamentales (Tamargo, 2004):

- Permiten el flujo de iones a través de la membrana celular a una velocidad superior a cualquier otro sistema biológico (10^8 iones/seg).
- Presentan selectividad iónica.
- En respuesta a un estímulo, las proteínas del canal son capaces de adoptar diversos estados conformacionales.

Atendiendo a sus propiedades cinéticas (activación-inactivación), características farmacológicas y al estímulo que determina el cambio conformacional de los canales iónicos, se los puede clasificar como se muestra en la Figura 9, siendo así: a) activados por cambios de voltaje, b) activados tras la interacción de un agonista con su receptor específico localizado en la superficie de la membrana celular, c) activados por mediadores intracelulares y d) activados tras deformación mecánica celular (Tamargo, 2004).

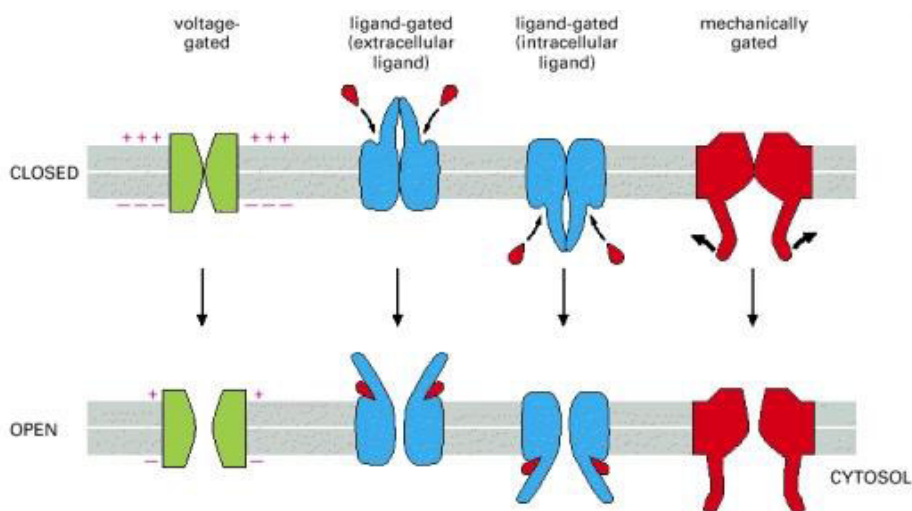


Figura 9. Canales iónicos. Dependiendo de sus características se pueden clasificar en (izq.-der.): **a)** activados por cambios de voltaje, **b)** activados tras la interacción de un agonista con su receptor específico localizado en la superficie de la membrana celular, **c)** activados por mediadores intracelulares y **d)** activados tras deformación mecánica celular.

Fuente: (Alberts, y otros, 2002)

Las probabilidades de cierre y apertura de los canales iónicos son controladas por sensores que pueden ser eléctrico, químico o mecánico. En los canales activados por voltaje, el sensor puede incluir varios aminoácidos cargados que se mueven en el

campo eléctrico de la membrana durante la apertura o cierre del canal (Martínez, 2004). Los canales iónicos activados por voltaje y por ligandos juegan un papel importante en condiciones fisiológicas tales como la señalización eléctrica, expresión génica, secreción de la hormona, el aprendizaje y la memoria (Arcangeli & Becchetti, 2015).

1.7.2. Canales iónicos como blancos terapéuticos

Los tratamientos que se usan actualmente para disminuir el cáncer presentan efectos secundarios que pueden ser muy severos para los pacientes, además de tener una baja supervivencia y resultados clínicos limitados. Es esencial el descubrimiento de nuevos objetivos terapéuticos que ayuden en la supervivencia y mejoren los resultados clínicos en pacientes con cáncer. Estudios actuales han demostrado que los canales iónicos, proteínas de membrana especializadas en el transporte de iones en las células, están involucrados en el desarrollo de varias enfermedades incluyendo el cáncer (Li & Xiong, 2011; Arcangeli & Becchetti, 2015).

Históricamente, la primera evidencia que se tiene del rol de los canales iónicos en cáncer, es el bloqueo de la proliferación celular. Es por eso que están implicados en rangos distintivos del cáncer comprendiendo, además del potencial de proliferación, la insensibilidad de señales anti-replicación, evitan la apoptosis y la respuesta inmune, estimulan la angiogénesis, aumentan la capacidad invasiva y la migración celular. Por ende, los canales iónicos pueden asignarse a tipos específicos de cáncer y ser las primeras pautas para un tratamiento dirigido (Li & Xiong, 2011).

1.7.3. Canales de potasio

Los canales de potasio son el grupo más numeroso y heterogéneo de proteínas transmembranales que permiten la permeabilidad de iones de potasio entre los ambientes intracelular y extracelular (Pardo & Stühmer, 2014; Tamargo, 2004).

Los canales que son activados por voltaje se encuentran formados por 4 monómeros; cada uno de estos está formado a su vez por 6 segmentos transmembranales (S1 a S6) como se observa en la Figura 10. La región del poro comprende los segmentos S5 y S6, que determinan la selectividad para los iones de

potasio. El segmento S4 conforma la parte sensorial del potencial, lo que permite al poro ser activado por voltaje (Tamargo, 2004).

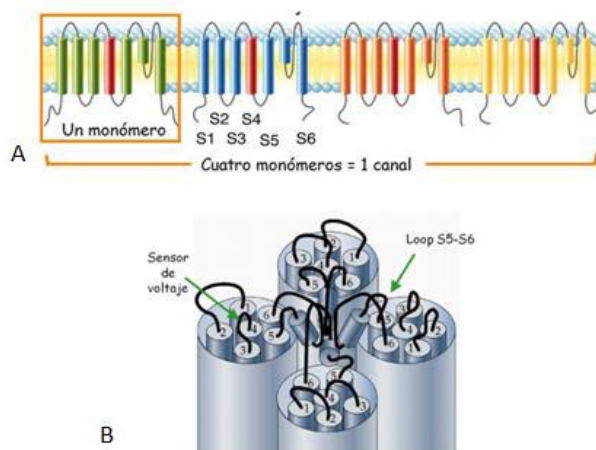


Figura 10. Canales de potasio. A. Estructura general de los canales de potasio activados por voltaje.

B. Esquema de un canal de potasio visto desde la parte superior.

Fuente: (Universidad de Buenos Aires, 2014)

Juegan un papel muy importante en la mayoría de las funciones fisiológicas como se muestra en la Figura 11, siendo así la transmisión simpática, contracción muscular, respuesta a la hipoxia, repolarización cardíaca, liberación hormonal, proliferación, volumen celular, apoptosis, migración e invasión celular, y angiogénesis (Pardo & Stühmer, 2014).

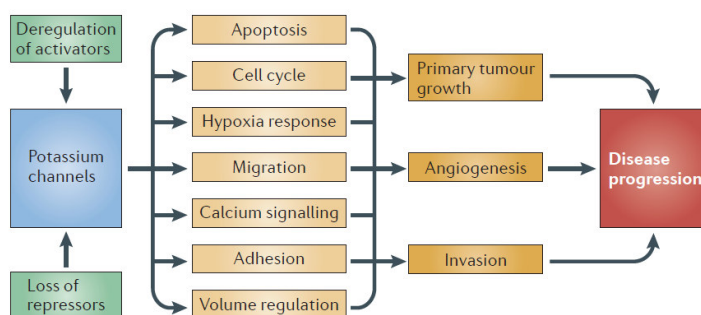


Figura 11. Funciones de los canales de potasio. Los canales de potasio se ven alterados genéticamente pueden inducir a cáncer ya que han perdido sus funciones principales.

Fuente: (Pardo & Stühmer, 2014)

Estos canales son responsables de la fase de repolarización del potencial de acción celular ya que se ha visto que el potencial de membrana hiperpolarizado se encuentra en tipos de células diferenciadas, tales como neuronas o cardiomiocitos, el potencial de membrana en reposo es de -60 a -80 mV, mientras que para las células de rápida proliferación como son las células embrionarias, células madre, o células de cáncer el potencial es más despolarizado, siendo el potencial de membrana en reposo de -20 a -40 mV (Universidad de Buenos Aires, 2014; Huang & Yeh, 2014).

Conjuntamente están involucrados en la regulación del potencial de membrana y en la regulación del ciclo celular ya que estos canales se activan en las fases G1 y M y se desactiva durante S y G2 dependiendo del potencial de membrana, ya que en G1 existe una alta permeabilidad de ion potasio y, M una baja permeabilidad (Urrego, Tomczak, Zahed, Stühmer, & Pardo, 2014; Ouadid & Ahidouch, 2013).

Se han reportado estudios en los cuales ciertas isoformas o la sobreexpresión de los canales de potasio estarían involucrados en cambios fisiológicos que permitan el desarrollo de algún tipo de cáncer ya que difieren de su función original. Estos hallazgos han despertado una nueva diana terapéutica de fármacos, toxinas y neurotransmisores que controlan la función celular por medio de canales de potasio (Pardo & Stühmer, 2014; Ouadid & Ahidouch, 2013).

1.7.4. Canal Eag-1

Eag-1 (Kv10.1, KCNH1) es un canal de potasio regulado por voltaje que se localiza en la membrana celular. Se encuentra distribuido normalmente en cerebro y centro nervioso central probablemente participando en señalización, pero también se lo encuentra en mioblastos, placenta, testículos y glándulas adrenales. Su localización genómica es en el brazo largo del cromosoma uno en la región tres y banda dos (1q32) (Rodríguez, Acuña, & Camacho, 2010; Asher, Sowter, Shaw, Bali, & Khan, 2010).

La estructura de este canal, como todo canal de potasio dependiente de voltaje, se lo puede observar en la Figura 12 y se encuentra conformado de cuatro

subunidades idénticas, cada una consta de seis dominios de membrana que abarca (S1-S6) con amino terminal (N) y carboxilo (C) terminal citoplasmáticos. La región del poro (P) se encuentra entre las posiciones S5 y S6, el cambio de voltaje se detecta por la cadena de residuos de arginina o lisina positivos en la tercera posición, separados por dos residuos hidrófobos dentro del dominio S4 que actúa como un sensor de tensión. El N-terminal se compone de un dominio conformado por: Per (proteína del periodo circadiano), Arnt (proteína translocadora del receptor nuclear Ah) y Sim (proteína single-minded que regula el desarrollo del sistema nervioso central de *Drosophila*), más conocido como dominio PAS que es un sensor de hipoxia que conduce a la activación del factor inducible de hipoxia 1 (HIF1), aumentando la glucólisis, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la vascularización, produciendo angiogénesis, dándole una ventaja de crecimiento selectiva a las células cancerosas en un entorno hipóxico. El C-terminal se compone de un dominio de unión de nucleótidos cíclicos (cNBD) y dominio de tetramerización con una señal de retención en el retículo endoplasmático (RXR), que está implicado en la tetramerización y la expresión funcional de los canales. También se encuentra presente en C-terminal múltiples módulos de señalización que incluyen secuencias putativas de exportación nuclear (NES) y secuencias de localización nuclear (NLS) con sitios de unión de calmodulina (CaM), calcio/CaM proteínas dependientes de cinasas II (CaMKII). Estos NES y NLS juegan un papel importante en la localización perinuclear de estos canales (Asher, Sowter, Shaw, Bali, & Khan, 2010).

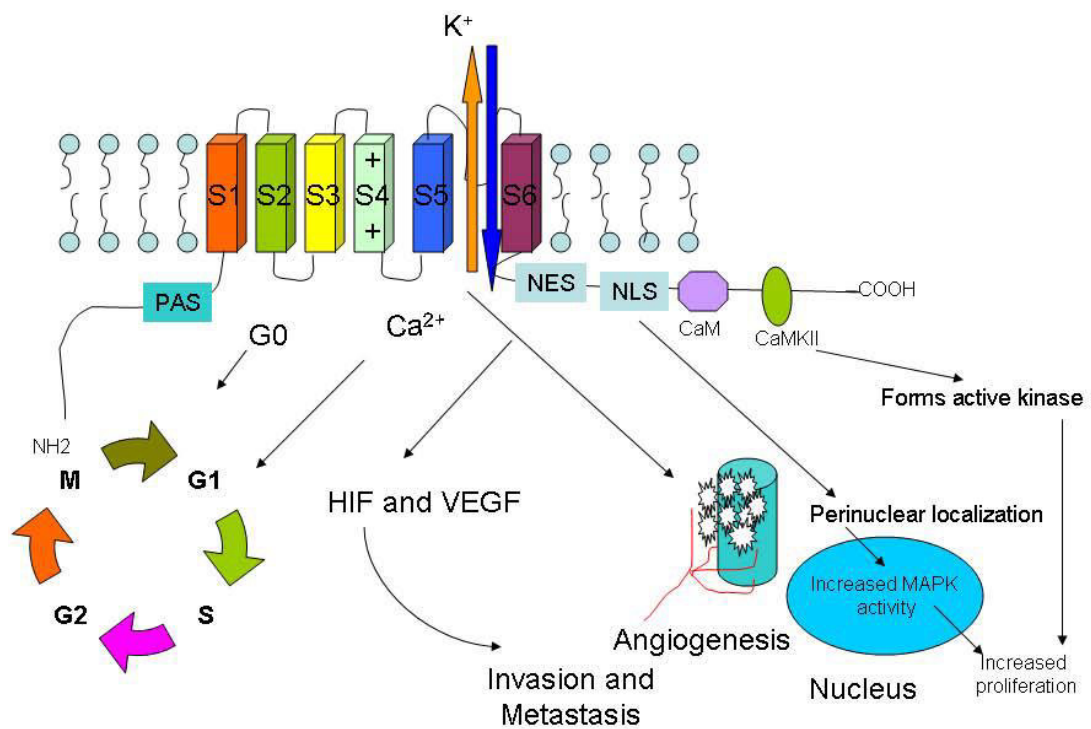


Figura 12. Canal Eag-1. Estructura del canal Eag-1 y sus funciones oncogénicas.

Fuente: (Asher, Sowter, Shaw, Bali, & Khan, 2010)

En contraste, Eag-1 se encuentra sobreexpresado en la mayoría de tumores incluyendo leucemia. Estudios muestran que la inhibición de la actividad o la expresión de Eag-1 reduce la proliferación tumoral *in vivo* e *in vitro* (Restrepo, Sánchez, & Camacho, 2011). Este canal posee propiedades oncogénicas ya que promueve la proliferación de células tumorales y son regulados por factores asociados a una transición epitelial a mesenquimal, que es un proceso celular reversible caracterizado por la pérdida de la polaridad celular (Camacho, 2006; Restrepo, Sánchez, & Camacho, 2011).

Estudios sugieren que se lo utilice como un marcador de cáncer, un potencial marcador temprano de cáncer y un marcador de pronóstico de enfermedades, ya que como se observa en la Figura 13 está presente en tejido sano, pero en tejido tumoral existe una sobreexpresión. La regulación del canal Eag-1 por carcinógenos y otros factores etiológicos de cáncer, así como su expresión en tejidos de cáncer y su asociación con una pobre supervivencia, hacen a estas proteínas excelentes biomarcadores oncológicos tanto para el diagnóstico como para terapias tempranas (Rodríguez, Acuña, & Camacho, 2010; Camacho, 2006).

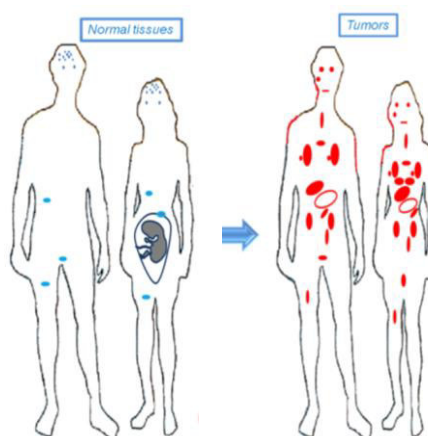


Figura 13. Canal Eag-1. Expresión de Eag-1 en tejidos normales y en cáncer, se observa una sobrexpresión en células tumorales.

Fuente: (Rodríguez, Acuña, & Camacho, 2010)

1.8. Fármacos en el tratamiento de cáncer

En la actualidad, para el cáncer de pulmón, se están usando terapias dirigidas con fármacos que ayuden a disminuir o contrarrestar por completo esta enfermedad. Se han diseñado una gran cantidad de medicamentos, los cuales se encuentran en estudios para su posterior incorporación en terapias humanas. Estudios demuestran que existe una correlación entre la vía de estrógeno y la vía del receptor del factor de crecimiento epidérmico (con sus siglas en inglés, EGFR) ya que ambos están relacionados en cáncer de pulmón (Shen, y otros, 2014). Además, el efecto biológico de los receptores de estrógenos (ER) puede limitar la eficacia de los inhibidores de EGFR debido a la interacción entre ER y EGFR (Shen, y otros, 2012).

1.8.1. Antihistamínico

Es un compuesto que pertenece a la clase de compuestos orgánicos conocidos como benzimidazoles, contiene un anillo de benceno fusionado a un anillo de imidazol (anillo de cinco miembros que contiene un átomo de nitrógeno, 4 átomos de carbono y dos dobles enlaces) (DrugBank, 2005), como se puede apreciar en la Figura 14.

Funciona como un antihistamínico selectivo de segunda generación que funciona como un antagonista del receptor de histamina H₁, contribuyendo a una

reducción de las respuestas asmáticas y alérgicas con poco o no efecto en el sistema nervioso central (Zhou, Vorperian, Gong, Zhang, & January, 1999; Fischer, y otros, 1997).

El antihistamínico inhibe al canal Eag-1 como se observa en la Figura 15 al impedir la entrada o salida de los iones de K^+ , disminuyendo la proliferación celular tumoral y en células de cáncer de hígado induce a apoptosis (Camacho, 2006; Chávez, Hernández, Vázquez, Gariglio, & Camacho, 2014; Chávez, y otros, 2015). Está asociado a efectos cardiacos adversos como arritmias o muertes súbitas por sobredosis, probablemente debidos a una acción sobre los receptores H_3 (Jie, y otros, 2015; Zhou, Vorperian, Gong, Zhang, & January, 1999).

Ha ganado un gran interés como un fármaco para el tratamiento contra el cáncer, ya que se une a proteínas involucradas en el cáncer como el receptor de histamina, glicoproteínas-P y canales de potasio (Chávez, Hernández, Vázquez, Gariglio, & Camacho, 2014; Chávez, y otros, 2015).

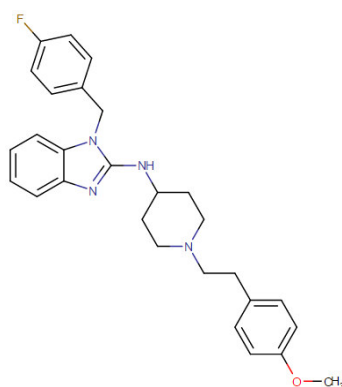


Figura 14. Antihistamínico. Estructura química.

Fuente: (DrugBank, 2005).

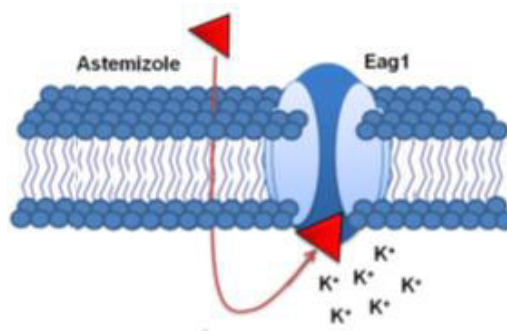


Figura 15. Antihistamínico. Mecanismo de acción sobre el canal Eag-1.

Fuente: (García, y otros, 2012).

1.8.2. Antagonista de los receptores de estrógeno

Es un compuesto perteneciente a la clase de compuestos orgánicos conocidos como estrógenos y derivados. Es un esteroide con una estructura que contiene un estrano 3-hidroxilado (DrugBank, 2005), estructura que se observa en el Figura 16.

Es el primero de un nuevo tipo de fármaco para un tratamiento endocrino, un antagonista de los receptores de estrógeno (con sus siglas en inglés, ER) que bloquea la actividad de ER α y ER β , reduciendo la expresión de ER α (Traynor, y otros, 2009; Osborne, Wakeling, & Nicholson, 2004).

ER α se encuentra en los alveolos, donde juega un papel muy importante en la regeneración alveolar inducida por estrógenos, mientras que ER β es altamente expresado en tejido epitelial de las vías respiratorias y en la mayoría de los tipos de cáncer de pulmón (Traynor, y otros, 2009). Además, la expresión de ER β disminuye en respuesta a un factor de crecimiento epidérmico (por sus siglas en inglés, EGF) y disminuye en respuesta a un inhibidor de EGF (Shen, Yuan, Sun, Gao, & Shu, 2010).

El complejo dimérico estrógeno-ER se une a una secuencia específica del ADN los cuales están situados en las regiones reguladoras de los genes sensibles al estrógeno. Una vez que se une a ER, no permite que se forme el dímero lo que limita totalmente la unión del receptor dimérico a la secuencia específica del ADN bloqueando así la localización nuclear del receptor, mecanismo de acción que está representado en la Figura 17. Además, este complejo es inestable y acelera la degradación de la proteína ER (Osborne, Wakeling, & Nicholson, 2004).

Un efecto secundario (con una incidencia menor al 1%) que produce es la formación de coágulos sanguíneos, incluso trombosis venosa profunda y émbolos pulmonares (Chemocare, 2016).

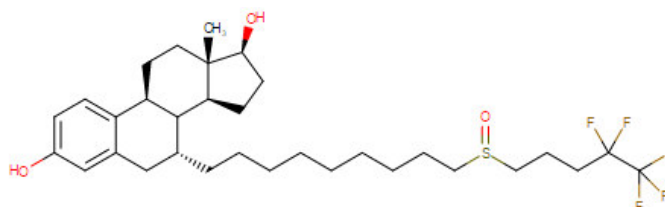


Figura 16. Antagonista de los receptores de estrógeno. Estructura química.

Fuente: (DrugBank, 2005).

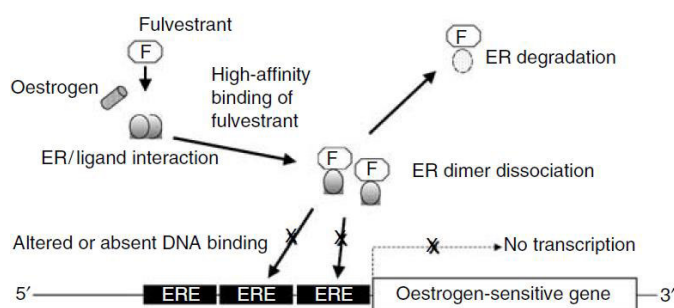


Figura 17. Antagonista de los receptores de estrógeno. Mecanismo de acción sobre los receptores de estrógeno (ER).

Fuente: (Osborne, Wakeling, & Nicholson, 2004).

1.8.3. Inhibidor del receptor tirosina quinasa

Este compuesto pertenece a la clase de compuestos orgánicos conocidos como quinazolinonas. Son compuestos aromáticos heterocíclicos que contienen un resto de quinazolina sustituidos por uno o más grupos amina (DrugBank, 2005), estructura descrita en la Figura 18.

Es un inhibidor del receptor tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico, EGFR-TKI, que bloquea las señales de traducción implicadas en la proliferación y supervivencia de células cancerígenas ya que no permite la fosforilación del EGFR, como se observa en la Figura 19 (Okubo, y otros,

2004). EGFR pertenece a la familia ErbB de receptores tirosina quinasa de la membrana plasmática que se sobreexpresa en cáncer de pulmón. La activación de EGFR promueve la proliferación de células tumorales, angiogénesis, invasión y metástasis (Shen, y otros, 2012)

Estudios recientes sugieren que induce a un retraso en el ciclo celular y en la apoptosis, e inhibe el EGFR en algunos tipos de cáncer *in vitro* e *in vivo* (Okubo, y otros, 2004). Además, ciertas mutaciones en EGFR (T790M, L858R y D761Y) permiten que exista sensibilidad o resistencia a un inhibidor del receptor tirosina quinasa (Engleman & Jänne, 2008; Toyooka, y otros, 2005).

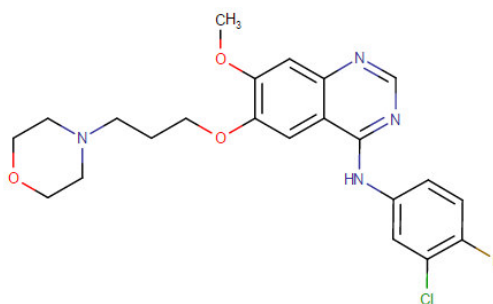


Figura 18. Inhibidor del receptor tirosina quinasa. Estructura química.

Fuente: (DrugBank, 2005).

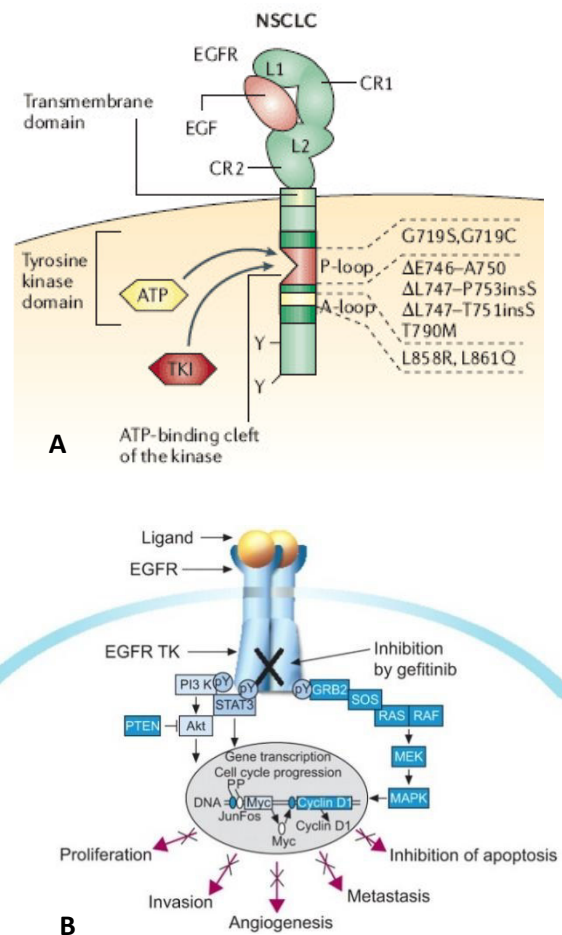


Figura 19. Inhibidor del receptor tirosina quinasa. A. Sitio de unión en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en el CPCNP. **B.** Mecanismo de acción sobre el EGFR.

Fuente: (Imai & Takaoka, 2006; Armour & Watkins, 2010).

1.9. Técnicas moleculares

En cuanto se refiere a las técnicas que se van a usar para el desarrollo del presente proyecto es la extracción de ARN de cultivos celulares, la forma de extraer ARN de la célula eficientemente es mediante la utilización de TRIzol, que es un reactivo listo para utilizarse en el aislamiento de ARN de células, es una solución monofásica de fenol e isocianato de guanidina, compuestos que inactivan RNAsas (enzimas que degradan rápidamente el ARN), lo que resulta muy favorable cuando se trabaja con muestras que poseen altos niveles de RNAsas endógenas, que durante la homogenización o lisis de la muestra mantiene la integridad del ARN, al mismo tiempo que altera la estabilidad de las células y disuelve los componentes celulares. Posteriormente se realiza una desproteización con cloroformo y una precipitación

diferencial con una sal (Pérez, 2016). La extracción de ARN se realizará con el objetivo de cuantificar la cantidad de ARN mensajero que presenta la célula para la traducción en el canal oncogénico Eag-1.

Además, se llevará a cabo la cuantificación de ARN en un NanoDrop, que es un espectrofotómetro de espectro total (220-750 nm) que mide concentraciones con 1 µl de muestra, con gran exactitud y reproductibilidad. Esta característica lo hace idóneo para medir la concentración de ácidos nucleicos y para determinar su calidad (Universidad Autónoma de Barcelona, 2016). Esto permitirá determinar la concentración de ARN que se tiene inicialmente para continuar con la retrotranscripción.

Posteriormente se realizará la purificación de ARN, debido a que la contaminación de ADN puede afectar de forma significativa a la sensibilidad y especificidad del resultado de expresión génica. El mejor método para evitar la contaminación de ADN genómico es el utilizar un método de extracción que combine la extracción orgánica en fenol (Trizol Reagent) y la posterior purificación en columna con DNAsa (Rodríguez, 2010).

Una vez ejecutada la purificación de ARN se proseguirá con la transcripción reversa (RT-PCR) que es una técnica que permite sintetizar ADN complementario (cDNA) a partir de moléculas de ARN usando para ello la enzima transcriptasa reversa. El cDNA obtenido es la cadena complementaria de la cadena molde de ARN (Rodríguez, 2016). La retrotranscripción se usará para transformar el ARN de las células a cDNA y para posteriormente ser cuantificado en PCR en tiempo real. La PCR en tiempo real es una técnica sencilla para la detección de ácidos nucleicos (ADN y ARN), combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia. Presenta una alta especificidad, amplio rango de detección y rapidez en la visualización del producto ya que no es necesario realizar una electroforesis posterior (Aguilera, Rocha, Pineda, & Chávez, 2016), técnica que se utilizará para medir la cantidad de ARN que se expresa en las células de la línea celular A549.

Finalmente se realizará una inmunocitoquímica, que es una técnica para localizar moléculas en células mediante el empleo de anticuerpos específicos, en este el canal de potasio Eag-1. Se basa en la gran especificidad y alta afinidad que tienen los anticuerpos para reconocer a moléculas y unirse a ellas. Además, la conjugación o combinación de los anticuerpos con enzimas o con sustancias fluorescentes permite detectar cantidades ínfimas de moléculas presentes en el tejido (Univerddidad de Vigo, 2015), técnica que servirá para realizar inmunoreactividad positiva de color café del canal Eag-1.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Participantes

La presente investigación se llevó a cabo bajo la dirección del Dr. Javier Camacho, Dra. Guadalupe Chávez, Dra. Violeta Zúñiga, Ms.C. Elizabeth Hernández y Biol. Eunice Vera con el seguimiento en la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE de la Dra. Marbel Torres.

2.2. Zona de estudio

La parte experimental se la realizó en su totalidad en el laboratorio 13 del Departamento de Farmacología del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), en la ciudad de México DF; proyecto que se llevó a cabo bajo la supervisión del Dr. Javier Camacho.

2.3. Periodo de tiempo de investigación

El proyecto tuvo una duración de 9 meses, a partir del 19 de octubre de 2015 hasta el 15 de julio de 2016.

2.4. Diseño y análisis de los datos

El diseño del presente proyecto es experimental exploratorio. Las etapas de la investigación fueron la evaluación del efecto de Astemizol, Gefitinib, Fulvestrant por separado y en combinación (Astemizol-Gefitinib y Astemizol-Fulvestrant) en la línea celular de cáncer de pulmón, A549, sobre la expresión génica y proteica del canal Eag-1.

2.5. Procedimiento

2.5.1. Antecedentes

En un trabajo previo, se realizaron curvas de proliferación de la línea celular de cáncer de pulmón A549, mediante ensayos de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro) con 2000 y 3000 células para asegurar que la línea celular experimental se encuentra en crecimiento exponencial y poder aplicar los tratamientos respectivos. Se determinó que 3000 células por pozo es el número idóneo para continuar con los experimentos por tener una mayor absorbancia, con una absorbancia de 0.9 a las 72 horas, ATCC indica que una buena lectura se encuentra entre 0.75 y 1.25 de absorbancia (ATCC, 2014).

Por otra parte, se realizó curvas dosis-respuesta utilizando diferentes concentraciones de los fármacos Z (Sigma-Aldrich), X (AstraZeneca) y Y (AstraZeneca) para determinar así la concentración inhibitoria del 20% (IC₂₀) y el 50% (IC₅₀). Las concentraciones inhibitorias que se obtuvieron se las puede apreciar en la Tabla 5.

Tabla 5.

Concentraciones inhibitorias del 20% y 50% de los fármacos.

Fármaco	Concentración inhibitoria del 20% (IC ₂₀)	Concentración inhibitoria del 50% (IC ₅₀)
Z	7.5 µM	9.22 µM
Y	Debido a que no realizó ningún efecto sobre la línea celular A549, se utilizó una concentración de 5 µM; concentración reportada por Siegfried, <i>et. al.</i> 2012	
X	15 µM	26.4 µM

Posteriormente, se llevó a cabo una curva dosis-respuesta con las concentraciones inhibitorias del 20% (IC₂₀) y 50% (IC₅₀) de los fármacos solos y sus combinaciones (Z-X y Z-Y), tratamientos observables en la Tabla 6.

Tabla 6.

Tratamientos de los fármacos solos y en combinación.

Tratamientos	
Vehículo	Z ₂₀ X ₂₀
Z ₂₀	Z ₅₀ X ₂₀
Z ₅₀	Z ₂₀ X ₅₀
X ₂₀	Z ₅₀ X ₅₀
X ₅₀	Z ₂₀ Y
Y	Z ₅₀ Y

Finalmente se escogieron las mejores combinaciones tomando en consideración una baja dosis y una disminución significativa en la densidad celular, siendo las combinaciones idóneas: Z IC₂₀ con X IC₂₀, Z₂₀X₂₀; y Z IC₅₀ con Y, Z₅₀Y. Ambas combinaciones fueron utilizadas para ver el efecto sobre la expresión genética y proteica del canal Eag-1.

2.5.2. PCR en tiempo real

Se cultivaron, en medio de cultivo F-12K (Gibco, No. CAT. 21127022) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) y 1% de antibiótico y antimicótico, aproximadamente 300 000 células de la línea de cáncer de pulmón A549, para cada uno de los tratamientos: Control (dimetilsulfóxido (DMSO)), Z IC₂₀ (Z₂₀), Z IC₅₀ (Z₅₀), X IC₂₀ (X₂₀), Y (Y) por separado y en combinación (Z-X (Z₂₀X₂₀), Z-Y (Z₅₀Y)) en cajas Petri de 100x15mm; se realizaron tres repeticiones biológicas y dos repeticiones técnicas. A las 24 horas se aplicaron los tratamientos correspondientes. El tiempo de incubación fue de 72 horas, con un cambio de medio a las 48 horas. Una vez culminado el tiempo, el medio de cultivo fue aspirado y las células fueron recuperadas con un scraper y 1 mL de Trizol; guardándolas en un tubo eppendorf de 1.5 mL a -70°C por una noche. Culminado ese tiempo, se realizó la extracción de ARN siguiendo el siguiente protocolo:

Primero se homogenizó la muestra en un vortex, luego se adicionó 200 μL de cloroformo para separar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. La muestra se centrifugó a 12000 rpm durante 30 minutos a 4°C . Posteriormente se recuperó el sobrenadante y se adicionó 500 μL de isopropanol para precipitar el ARN, se incubó durante 2 horas a -70°C y se centrifugó a 12 000 rpm por 30 minutos a 4°C . A continuación se eliminó el sobrenadante y se adicionó 1 mL de etanol (75%) para lavar el ARN, se centrifugó a 12 000 rpm por 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante y se secó a temperatura ambiente. Finalmente se re-suspendió el pellet en 20 μL de agua libre de nucleasas (el volumen de agua puede variar dependiendo del tamaño del pellet de ARN obtenido, entre 10-40 μL) y se almacenó a -70°C por una noche para estabilizar el ARN.

Una vez estabilizado el ARN, fue cuantificado por espectrofotometría utilizando un NanoDrop Lite (Thermo Scientific). Se consideró un ARN puro, íntegro y libre de contaminación cuando la relación A260/280 es ligeramente mayor o igual a 2. Se procedió a medir la concentración de ARN de todos los tratamientos. Posteriormente se tomaron 5 μg de cada muestra y fueron purificados con DNAsa a una concentración de 1 U/ μL , la cual se preparó con los siguientes reactivos: DNAsa I RNAsa-Free 10 U/ μl , Roche (Cat. No. 776785), Tris-Clorhídrico, Sigma (Cat. No. T-3253), Cloruro de Magnesio anhidro, Sigma (Cat. No. M-8266), Cloruro de Calcio anhidro, J.T. Baker (Cat. No. 1308), Agua ultrapura libre de nucleasas, Invitrogen (Cat. No. 10977-015), en la Tabla 7 se indican el protocolo de preparación.

Tabla 7.

Protocolo de preparación de DNAsa para limpiar el ARN de ADN genómico.

Reactivo	Volumen (μL)
H ₂ O libre de nucleasas	166.4
TRIS-HCl (1M)	8
MgCl ₂ (250mM)	4.8
CaCl ₂ (500mM)	0.8
DNAsa (10 U/ μl)	20
Total:	200 U/ μl

$$\text{Volumen Total} = 0.5 \mu\text{L DNAsa} + \text{Volumen}_{\text{ARN}} (5\mu\text{g}) + V_{\text{H}_2\text{O}} = 10 \mu\text{L}$$

Los tubos se colocaron en un termociclador 2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, y se sometió al siguiente programa de temperaturas y tiempos:

Para el ciclo de activación de DNAsa (1 U/ μL) se empleó una temperatura de 37°C durante 60 minutos. Consecutivamente el ciclo de desactivación o desnaturalización de DNAsa fue a una temperatura de 75°C durante 5 minutos, y finalmente el ciclo de enfriamiento a 4°C.

Para determinar la integridad de ARN de las muestras, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% comprobando la presencia de las subunidades ribosomales mayor (28S) y menor (18S). Se realizó utilizando una solución de 0.5 g de agarosa, 50 mL de TBE 1X y 1 μl de bromuro de etidio. Para la corrida de electroforesis se programó 40 Voltios (V) y 400 miliVoltios (mV) por 10 minutos para homogeneizar las muestras. Luego se programó 100 V y 400 mV por 35 minutos para la corrida, en una cámara de electroforesis LabNet, PowerStation 300.

Por otra parte, con 10 μL de ARN (5 μg) libre de DNA, se realizó la retrotranscripción utilizando Oligo dt 12-18 pb primer (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), Sigma-Aldrich; dNTP mix (10 mM), New England Biolabs (CAT. No. N0446S); RNase OUT (40 U/ μl), Invitrogen CAT. No. 10777-019; M-MuLV (Moloney Murine LeuKemia Virus) (200 U/ μl), Reverse Transcriptase, New England Biolabs (Cat. No. M0253S); NE Buffer MMuLV Reverse Transcriptase 10X; Agua libre de nucleasas Invitrogen, Cat. No. 10977-015; y un termociclador, 2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems. En la Tabla 8 se observa protocolo y las condiciones a la que es sometida la retrotranscripción.

Tabla 8.

Protocolo de retrotranscripción.

	Reactivos	1X (μL)	Condiciones
Mix 1	Oligo dt (1 U/μl)	1	1 ciclo a 37°C durante 5 minutos, activación de enzimas.
	dNTPs (10mM)	1	
	Muestra	10	
	Total: 12 μL		
Mix 2	Buffer de M-MuLV (10X)	2.5	1 ciclo a 37°C durante 50 minutos, para activar enzimas.
	RNasa-OUT (40 U/μl)	1	1 ciclo a 70°C durante 15 minutos, para inactivar enzimas.
	H ₂ O libre de nucleasas	3.5	
	M-MuLV (200 U/μl)	0.3	
	Total: 7.3 μL		1 ciclo a 4°C durante 60 minutos, enfriamiento.
Volumen final: 19.3 μL de cDNA			

Finalmente, se utilizó 1 μL de cDNA de cada tratamiento para determinar la expresión del ARNm por medio de PCR en tiempo real. Se usaron sondas TaqMan del canal de potasio, dependiente de voltaje Eag asociado a la Subfamilia H, Miembro 1 (Eag-1, *KCNH1*), Applied Biosystems, Hs00924320_m1; TaqMan de hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa de humano (*h-HPRT*), Applied Biosystems, Mm03024075_m1; a una concentración de 20X, y una TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X), Applied Biosystems, CAT. No. 4304437.1-Pack; siguiendo el protocolo de la Tabla 9 y usando un termociclador de tiempo real, StepOnePlus, Applied Biosystems, Real-Time, PCR System, No. 271003422, el diseño de la placa se observa en la Figura 20.

Tabla 9.

Protocolo de PCR en tiempo real.

Reactivos	1X (μL)	Condiciones de la PCR
TaqMan Master Mix (2X)	5	Se realizaron 40 ciclos de PCR cada ciclo y comprende: 10 segundos de desnaturalización, 95°C. 1 minuto de alineamiento, 60°C
*Sonda <i>h-HPRT</i> (20X)	0.5	
*Sonda <i>KCNH1</i> (20X)		
cDNA	1	
H ₂ O libre de nucleasas	3.5	
Volumen final: 10 μL		

*Cada sonda se realizó por separado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Figura 20. PCR en tiempo real. Diseño de placa (placa de 96 pocillos). **Gris:** sonda escogida.
Celeste: sonda Eag-1 (KCNH1)

El método de análisis que se aplicó fue el doble delta Ct ($\Delta\Delta Ct$), como se describe a continuación:

Primeramente se promediaron los resultados de Ct de los duplicados de cada tratamiento. Luego se calculó el primer delta Ct (ΔCt) con la siguiente fórmula:

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

Una vez obtenidos los promedios se calculó el doble delta ($\Delta\Delta Ct$) aplicando la siguiente fórmula:

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

Finalmente la expresión relativa del gen de interés con respecto al gen endógeno se calculó con la fórmula:

$$\text{Expresión Relativa [gen problema/gen endógeno]} = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

Este método se utilizó porque permite comparar directamente los Cts (threshold cycle o ciclo umbral) del gen problema con respecto de otro gen constitutivo o endógeno.

Por otra parte, se determinó la eficiencia de amplificación y la sensibilidad de la técnica en PCR en tiempo real realizando una curva estándar a partir de diluciones seriadas (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32) del gen problema (Eag-1, *KCNH1*) y el gen endógeno (*h*-HPRT) con 1 μ L cDNA de células de cáncer de pulmón A549 sin

ningún tratamiento, siguiendo igualmente el protocolo de la Tabla 9. El método de análisis se describe a continuación:

Se promediaron los resultados de Ct de los duplicados, teniendo en cuenta que la desviación estándar entre los diferentes Ct debe ser menor a 0,2. Luego se construyó una curva con el logaritmo de las concentraciones seriadas y sus respectivos valores de Ct. Al obtener la pendiente de la recta, esta debe ser cercana a -3.32 lo que indica que la eficiencia de la amplificación es igual al 100% (hasta un valor de 92% es confiable). Para el cálculo de la eficiencia de amplificación se usó la siguiente fórmula, reemplazando el valor de la pendiente (m) obtenida anteriormente:

$$Eficiencia = 10^{-\frac{1}{m}} - 1$$

Finalmente se realizó la gráfica del ΔCt (Ct gen problema – Ct gen endógeno) con las diluciones seriadas, de igual manera se obtiene la pendiente de la recta y si esta es menor o igual a 0.1, valida la utilización del método ΔCt ya que requiere que la eficiencia de amplificación de ambos genes (endógeno y problema) sea la misma.

2.5.3. Determinación del canal Eag-1 por inmunocitoquímica

La técnica de inmunocitoquímica es un método que permite la localización de proteínas en muestras de tejidos o cultivos celulares, usando anticuerpos tipo inmunoglobulina-G. Para el canal Eag-1 se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo KCNH1, NOVUS, CAT. No. NBP1-42816B. Además, se utilizaron como control positivo células CHO (células de ovario de hámster chino) transfectadas con el gen del canal potasio Eag-1 (CHOpt); y como control negativo células CHO wild type (CHOwt) que expresan muy poca o no expresan este canal de potasio.

Para lograr una muestra de células adherida a la placa porta objetos, se debe preparar un cultivo de la siguiente manera:

Primero se colocó una placa porta objetos de 26x76x1,1 mm dentro de una caja Petri de 100x15 mm, y se esterilizó con luz UV la caja en conjunto con la placa porta objetos. Posteriormente se sembraron 400 000 células por caja, procurando que

las células queden adheridas en la superficie de la placa porta objetos. Luego de 24 horas se reemplazó el medio de cultivo por 8 mL del tratamiento respectivo: Control, Z IC₂₀ (Z₂₀), Z IC₅₀ (Z₅₀), X IC₂₀ (X₂₀), Y (Y) por separado y en combinación (Z-X (Z₂₀X₂₀), Z-Y (Z₅₀Y)); se incubó por 72 horas y a las 48 horas se hizo un cambio de medio y una vez cumplido el tiempo del tratamiento, se retiró el medio de cultivo por succión al vacío. Finalmente se fijaron las células en la placa porta objetos, esto se logra deshidratando las células con dos baños de etanol al 96% por 30 segundos cada uno, y una vez fijadas las células en las placas, se agregó 8 mL PBS para preservar las células hasta ser sometidas al proceso de inmunocitoquímica.

Para lograr la reacción inmuno-enzimática, se utilizó el sistema de inmunodetección Mouse/Rabbit InmunoDetector HRP/DAB DetectionSystem, Bio SB, CAT. No. BSB 0005, el procedimiento que se detalla a continuación:

Primero se procede a realizar un lavado a las placas con buffer de lavado (solución PBS + Tween), se montan las placas porta objetos en la gradilla para inmunocitoquímica y se realizó un segundo lavado con el buffer de lavado. Luego se agregaron 100 µL de bloqueador de peroxidasa por 10 minutos y se enjuagó con buffer de lavado. Posteriormente se agregaron 100 µL de bloqueador background sniper (caseína) por 10 minutos y se enjuagó con buffer de lavado. Consecutivamente se expuso la muestra a 100 µL del anticuerpo para Eag-1 a una dilución de 1:500 por 24 horas y se enjuagó con buffer de lavado. Seguidamente se agregó 100 µL de anticuerpo biotinilado, durante 15 minutos y se enjuagó con buffer de lavado. Posteriormente se agregó 100 µL del conjugado estreptavidina-HRP (peroxidasa de rábano picante) durante 15 minutos, se enjuagó con buffer de lavado y se desmontó de la gradilla cuidadosamente. A continuación, se colocó sobre la muestra 100 µL de solución de revelado (solución de revelado: 1 mL de buffer de revelado + 100 µL de diaminobenzidina, DAB) durante 20 segundos y se enjuagó con buffer de lavado. Se contrastaron las muestras, aplicando 500 µL de hematoxilina durante 10 segundos y se enjuagó con buffer de lavado. Finalmente, para el proceso de fijación se colocaron las laminillas en agua bidestilada, luego se enjuagaron en agua amoniacal rápidamente y se conservaron las placas porta objetos en agua. Seguidamente se deshidrataron las muestras realizando baños consecutivos de:

- a. Etanol 70%
- b. Alcohol absoluto
- c. Xilol – alcohol absoluto (solución 1:1)
- d. Xilol

Luego se fijó un cubre objetos sobre la muestra con resina, se dejó reposar durante una noche y se observó en microscopio invertido motorizado OLYMPUS IX51, a 40X.

2.5.4. Análisis de datos

De acuerdo a los datos obtenidos con anterioridad se realizará un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor, seguida de una prueba de Tukey, la cual realiza comparaciones entre los resultados promedios de todos los grupos obtenidos. La prueba de análisis de varianza se aplica para contrastar la igualdad de medias de tres o más poblaciones independientes y con distribución normal (Gutiérrez & De la Vara, 2008). Esta prueba permite comparar las medias entre tratamientos. Además, se manejó un nivel de significancia del 5% ($p < 0.05$) y se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism versión 5.0. Los resultados se reportaron como promedio \pm desviación estándar (SD).

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

El campo de la combinación de fármacos ha avanzado considerablemente desde el predominio de los estudios clínicos empíricos que se basan en investigaciones preclínicas que tratan de identificar las interacciones sinérgicas o aditivas con los agentes existentes, o en la combinación de fármacos clínicamente activos. La coadministración de fármacos tiene como objetivo principal disminuir las dosis terapéuticas, minimizar el desarrollo de resistencia, reducir toxicidad y aumentar la eficacia de los fármacos que tienen efecto por si solos (Al-Lazikani, Banerji, & Workman, 2012). Un estudio realizado por García, *et. al.* (2014) con Calcitrol y Z en células de cáncer de mama, observaron una disminución en la expresión génica del canal Eag-1 cuando se usan en combinación estos fármacos, mientras que por si solos su disminución no es significativa. Tomando en consideración estos antecedentes se propuso una combinación de fármacos, Z-X y Z-Y, para disminuir la expresión del canal Eag-1 que se encuentra sobreexpresado en células tumorales.

X es un medicamento que está indicado para el tratamiento de primera línea de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico, cuyos tumores presentan en genoma deleciones del exón 19 o mutaciones de sustituciones en el exón 21 (L858R) de EGFR (AstraZeneca, 2015). Un estudio realizado, donde se analizó 809 casos de pacientes con mutaciones en EGFR, permitió determinar que 46% presenta la deleción del exón 19 (Glu746_Ala750del), seguida por la mutación puntual del exón 21 (L858R) en 42% de los casos, y en menor proporción, por la mutación del exón 18 (G719L, 6%), y por la presentación basal de la mutación en el exón 20 (T790M) en 3-7% de los pacientes (Castro, y otros, 2010). Las principales causas de resistencia al tratamiento a X son la forma normal (wild type (WT)) del EGFR, mutaciones en el gen KRAS, mutación de EGFR T790M y amplificación del EGFR de hepatocitos (Bautista, y otros, 2010). La línea celular A549 presenta la forma WT del EGFR (Tracy, y otros, 2004) y la mutación en el gen K-ras (Krypuy, Newnham, Thomas, Conron, & Dobrovic, 2006), razón por la cual las concentraciones

inhibitorias (IC) de X son mayores que Z. La unión del EGFR con su respectivo ligando induce a una dimerización de EGFR que dirige vías de señalización como MAPK, PI3K y STAT; vías responsables de la mitosis, cambios en los patrones de expresión génica, movimiento, metabolismo, muerte celular programada permitiendo a las células sobrevivir, proliferar, inducir apoptosis, interactuar con múltiples tipos celulares, etc. (Zhang, Díaz, & Yee, 2013; Salinas, Giménez, Serrano, Cha, & Sánchez, 2011), razón por la cual, al bloquear estas vías se observa una disminución en la densidad celular y un cambio en la morfología, ya que un cambio en la morfología celular conlleva a apoptosis, debido a que la principal característica es un disminución en el volumen celular y pérdida de la adhesión (Medmol, 2007). La morfología se ve modificada en los diferentes tratamientos, lo que podría estar llevando a las células a apoptosis, sin embargo no presenta efecto alguno sobre el canal Eag-1.

Por otra parte, estudios actuales muestran el rol de los estrógenos en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer como es el caso del cáncer de pulmón. La estimulación con estrógeno promueve la proliferación en células de cáncer de pulmón y fibroblastos pulmonares, e incrementa el volumen tumoral en modelos murinos. Este proceso, que se inicia en la membrana plasmática, conduce a cambios en la proteína de estructura/función y la transcripción de genes que son imprescindibles en la obtención de respuestas completas al estrógeno (Hershberger & Siegfried, 2012). Se ha visto que los receptores de estrógenos ER α (localizado principalmente en útero, hígado, riñón y corazón) y ER β (localizado en ovario, próstata, pulmón, vejiga, tracto gastrointestinal y sistema nervioso central) al unirse con el estradiol incrementan la transcripción de genes asociados a la proliferación y favorecen la expresión de quimiocinas involucradas en la progresión tumoral. Además, activan rápidamente vías de señalización de segundos mensajeros, lo que lleva a un aumento intracelular de monofosfato de adenosin cíclico (cAMP), en flujo de calcio, la activación de vías de señalización de quinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK) y PI3K. Satler, *et. al.* (1996) determinaron que la unión de cAMP a nivel de cNBD en el canal HERG (canal de potasio regulado por voltaje) aumenta su corriente facilitando la salida de iones de potasio. Además, se ha observado un entrecruzamiento entre las vías de señalización de EGFR y la vía no

genómica de receptores de estrógenos que desencadena en supervivencia y proliferación celular (Stabel & Siegfried, 2004; Hershberger, y otros, 2009; Rodríguez, y otros, 2015). La unión de estradiol (E_2) a los ER localizadas en la membrana plasmática conduce a la activación de metaloproteinasas de la matriz (MMPs). MMPs catalizan la liberación de ligandos de EGFR (por ejemplo, HB-EGF) de la superficie celular. Los ligandos libres se unen al EGFR y desencadenan la activación de vías de señalización corriente abajo. ERK se transloca al núcleo después de su activación y puede fosforilar y activar a los ER de una manera independiente de ligando (Hershberger & Siegfried, 2012) entrecruzamiento que se puede observar en el ANEXO A. Por otra parte, en ensayos realizados por Hutcheson, *et. al.* (2011) observó que Y induce la expresión proteica y la actividad de ErbB3 y ErbB4 (homólogos a EGFR) en células de cáncer de mama. Shen, *et. al.* (2014) utilizaron Y para sensibilizar a células de CPCNP a X, ya que Y aumentó la regulación de let-7 microARN que está asociado a una represión de RAS y una inactivación de Akt y ERK.

Y es un medicamento antagónico competitivo del receptor de estrógenos con una afinidad (89%) comparable al estradiol, su mecanismo de acción está asociado con la regulación a la baja de los niveles de las proteínas del receptor de estrógeno, $ER\alpha$ y $ER\beta$. Los $ER\alpha$ y $ER\beta$ se han observado que se expresan y son funcionales en la mayoría de las líneas celulares de CPCNP, células y tejidos derivadas de pulmón normal (Traynor, y otros, 2009). Un decremento en los niveles de expresión proteica de los ER resulta en una activación de EGFR (Zhang, Díaz, & Yee, 2013). Hershberger, *et. al.* (2009), por medio de inmunoreactividad determinó que el $ER\beta$ se encuentra en el citoplasma celular del CPCNP, lo que concuerda con la inmunocitoquímica que se realizó para determinar si la línea celular A549 expresaba este receptor. Shen, *et. al.* (2012) de igual manera realizó ensayos en los cuales observó ambos receptores en la línea celular A549. En el ANEXO B se puede observar la inmunocitoquímica para el $ER\alpha$ y el $ER\beta$. Cuando Y se une a los monómeros del receptor de estrógenos inhibe la dimerización del receptor, desactivando los factores activadores 1 (AF1) y 2 (AF2), reduciendo la traslocación del receptor al núcleo y acelerando la degradación del ER. Las dos funciones de activación de los receptores de estrógeno por AF1 y AF2, es reclutar coactivadores o

correpresores de la transcripción guiada por estrógenos. La actividad de AF1 se regula a través de la vía activada por MAPK, y AF2 se activa por el estradiol; factores que son responsables de efectos estrogénicos. La vía MAPK puede ser activado a través de la respuesta del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y la respuesta de la insulina como factor de crecimiento (IGF). Por lo tanto, las vías de EGF e IGF pueden conducir a la activación del receptor de estrógeno de una manera independiente de las hormonas esteroides o antagonistas de hormonas esteroides (Carlson, 2005). Además, existen señales que pueden activar el ER nuclear por mecanismos que no dependen de ligando. La fosforilación del ER α en el punto de serina 118 puede darse por la proteína MAPK, que activa el receptor; o por Akt que fosforila directamente al receptor α causando la activación de genes blanco de estrógeno y los activa independientemente del ligando (Loose & Stancel, 2012). Con estas referencias se puede estipular que la expresión del canal Eag-1 sigue normalmente, ya que las vías de proliferación no se han bloqueado y como se sabe, este canal es un regulador del ciclo celular.

Z es un antihistamínico de segunda generación antagonista selectivo del receptor de histamina 1 (H1). Estudios previos han demostrado que la histamina está involucrada en la proliferación celular, desarrollo embrionario y en el crecimiento tumoral. Estos efectos biológicos son activados a través de la unión de la histamina a los diferentes tipos de receptores de histamina (H1, H2, H3, H4). El receptor de histamina tipo 1 (H1) se expresa en diversos tejidos incluyendo cerebro, músculo bronquial liso, células gastrointestinales, cardiovasculares, endoteliales y linfocitos (Blaya, y otros, 2010; García & Camacho, 2011). Por otra parte, se han realizado investigaciones en las cuales Z también detiene la proliferación de linfomas impulsada principalmente mediante la desactivación del complejo represivo Polycomb 2 (PRC2) a través de la destrucción específica del complejo EZH2-EED (proteínas que activan el PRC2), ya que Z puede unirse a EED de manera competitiva con EZH2. Los estudios revelan que el Z perjudica la actividad PRC2 a través de la disociación del complejo EZH2-EED y desestabilización de complejo PRC2. El complejo EZH2-EED se encuentra sobreexpresando los componentes del complejo PRC2 en cáncer de pulmón de células no pequeñas (Barsotti, Ryskin, Kung, Verhelle, & Rollins, 2015; Kong, y otros, 2014). Actualmente se encuentra en

estudio debido a que otro de sus blancos es el canal de potasio Eag-1, ya que impide la entrada o salida de iones de potasio disminuyendo la proliferación celular tumoral (García, y otros, 2012). Sin embargo, el potasio es el mayor catión intracelular con el 98% y se ve relacionado con diferentes funciones en el organismo puesto que participa en la síntesis de proteínas y ADN, promueve el crecimiento celular, división celular, regulación del volumen celular y homeostasis celular. La liberación de iones de potasio causa la alteración en la homeostasis celular lo que conlleva a la necrosis o apoptosis (Pohl, Wheeler, & Murray, 2013; Peralta, 2009). El Z al bloquear la actividad del canal Eag-1 puede estar induciendo a una disminución celular y por ende, un cambio en el ciclo celular.

Los canales iónicos contribuyen prácticamente en todos los procesos celulares básicos y también participan en el fenotipo maligno de las células cancerosas, se ven involucrados en seis diferentes procesos como: 1) autosuficiencia en las señales de crecimiento, 2) falta de sensibilidad a las señales anti-proliferativos, 3) evasión de muerte celular programada (apoptosis), 4) ilimitado potencial de replicación, 5) sostenida angiogénesis e 6) invasión tisular y metástasis (Prevarskaya, Skryma, & Shuba, 2010).

Los canales de potasio son importantes ya que determinan la proliferación fisiológica y patológica a través del potencial de membrana, volumen celular y los cambios de pH durante el ciclo celular. La actividad del canal de potasio se altera durante la progresión del ciclo celular y la inhibición de estos canales tiene un efecto anti-proliferativo. Eag-1 es un canal de potasio regulado por voltaje que se encuentra distribuido normalmente en cerebro, placenta, testículos y glándulas adrenales. Este canal se encuentra sobreexpresado en la mayoría de tumores y estudios demuestran que la inhibición de la actividad o la expresión de Eag-1 reduce significativamente la proliferación tumoral *in vitro* e *in vivo*. Estudios realizados por Chávez, *et. al*, (2014) en células de cáncer cervical observó que este canal se encuentra sobreexpresado. Los canales de Eag-1 poseen propiedades oncogénicas que promueven la proliferación de células tumorales y son regulados por factores asociados a una transición epitelial o mesenquimal, que es un proceso celular reversible caracterizado por la pérdida de la polaridad celular. Otro estudio realizado por Ortiz, *et. al*, (2011)

en displasia cervical, pudieron determinar, por medio de inmunohistoquímica, que la expresión del canal Eag-1 depende del grado de lesión. Esto sugiere que el canal Eag-1 puede ser usado como un posible marcador tumoral. Además juega un papel muy importante en la mayoría de las funciones fisiológicas, siendo así la transmisión simpática, contracción muscular, respuesta a la hipoxia, liberación hormonal, proliferación, volumen celular, apoptosis, migración e invasión celular, y angiogénesis. Conjuntamente están involucrados en la regulación del potencial de membrana y en la regulación del ciclo celular ya que uno de estos canales se activa en las fases G1 y M y se desactiva durante S y G2, dependiendo del potencial de membrana ya que en G1 existe una alta permeabilidad de potasio y en M una baja permeabilidad. Aparte de estar involucrado en el ciclo celular, también activa la vía MAPK, vía involucrada en proliferación (Oquadid & Ahidouch, 2013; Camacho, 2006; Urrego, Tomczak, Zahed, Stühmer, & Pardo, 2014). Por lo general, las células cancerosas tienen menos potencial de membrana que las células normales, por lo tanto, es probable que se requieran una mayor expresión de ciertos tipos de canales de potasio para producir una hiperpolarización. La inhibición de Eag-1 por Z que induce un decremento en la expresión de la ciclina D1 y E, junto con una disminución en la fosforilación de pRb y una detención de las células en la fase G1 y S del ciclo celular, disminuye la proliferación celular (Prevarskaya, Skryma, & Shuba, 2010; Oquadid & Ahidouch, 2013). Estos antecedentes concuerdan con los resultados obtenidos, ya que Z cambió la morfología y se observó una disminución en la expresión génica y proteica del canal Eag-1 solo, y aún más en combinación con X. Por otra parte, Y aumentó ligeramente la expresión génica del canal, lo que concuerda con Díaz, *et. al.* (2009) ya que observaron que la expresión génica del canal Eag-1 en líneas celulares de cáncer cervical y cáncer de pulmón aumenta en presencia de Y, y que la expresión del canal Eag-1 se encuentra regulada por factores oncogénicos como los estrógenos y el virus de papiloma humano (HPV) en ciertos tipos de cáncer.

Estudios realizados en osteosarcoma indican que el canal Eag-1 contribuye a la progresión tumoral independientemente de su función principal como un canal iónico. Por otra parte, la sobreexpresión del canal es regulada por la vía MAPK independiente del flujo de potasio. Eag-1 puede regular la expresión de ciclina D1 y

E activando las vías de señalización MAPK y PI3K, ya que cuando estas vías se inhiben, la proliferación celular se ve disminuida (Wu, y otros, 2014).

Las proteínas que tienen que ser transportadas del citoplasma al núcleo o viceversa portan señales que permiten el reconocimiento por parte de proteínas transportadoras. Esta señal es generalmente una secuencia de aminoácidos corta que en el caso de los sistemas de importación nuclear se denominan señales de localización nuclear (NLS) y en los sistemas de exportación nuclear se denominan señal de exportación nuclear (NES) (Araújo, 2008). Estas NES y NLS juegan un rol importante en la localización perinuclear del canal de Eag-1, ya que NLS es una parte necesaria que permite dirigir proteínas transmembrana a la membrana interna nuclear. Además, NLS permite activar la vía señalización de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) que regula la morfología celular (Chen, 2010; Asher, Sowter, Shaw, Bali, & Khan, 2010). La mayoría del canal de Eag-1 permanece en el citoplasma, incluyendo la región perinuclear, en sistemas heterólogos, neuronas o células tumorales (Chen, 2010). Gomez, *et. al.*, 2006 realizó estudios en un canal de calcio dependiente de voltaje observando que su NLS trasloca a núcleo y funciona como un factor de transcripción. La localización celular de Eag-1, mediante inmunocitoquímica, fue mayoritariamente en el citoplasma, aunque en ciertas células también se observó su presencia en el núcleo (como se puede observar en el ANEXO C). Se presume que es debido a las dos señales, NES y NLS, que posee el canal se lo puede encontrar traslocado en el núcleo o, simplemente por su función en la replicación celular, modulando las diferentes fases del ciclo celular.

Se presume que existe un relación entre el EGFR y el canal Eag-1, y esto se demuestra con el trabajo realizado por Wu, *et. al.* (2012) ya que encontraron tres residuos de tirosina: Tyr90 que se encuentra en el N-terminal, Try344 en la región citoplasmática transmembranas entre S4 y S5, y Try485 en el C-terminal que son claramente responsables de la fosforilación del canal Eag-1. Si se presentan los tres sitios mutantes Y90, Y344 y Y485 conceden resistencia a AG556, un inhibidor de EGFR, lo que sugiere que Y90, Y344 y Y485 son responsables de la fosforilación de tirosina de Eag-1 por EGFR cinasa; lo que concuerda con la inmunocitoquímica, ya

que en el tratamiento con X no hubo una disminución del canal Eag-1 y se presume que estas tirosinas también estarían provocando una resistencia a X.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

- La combinación de los fármacos Z-X y Z-Y disminuyó la expresión génica y proteica del canal de potasio Eag-1 en comparación a los fármacos solos, lo que podría ser una posible terapia frente al cáncer de pulmón no microcítico.
- La expresión génica del canal de potasio Eag-1 no es afectada o se observa un ligero aumento en presencia de X y Y, ya que estos fármacos no hacen efecto alguno sobre el canal. Por otro lado, Z disminuye mayoritariamente su expresión ya que es un bloqueador de canal de potasio. Por ende, la combinación de fármacos (Z-X y Z-Y) disminuye significativamente la expresión en comparación a los fármacos solos.
- La inmunoreactividad positiva sobre la expresión proteica del canal de potasio Eag-1 se ve disminuida cuando se utiliza la combinación de fármacos (Z-X y Z-Y) en comparación a los fármacos solos y al control.
- La disminución en la expresión del canal Eag-1 es un posible mecanismo molecular por el cual las combinaciones disminuyen la proliferación de las células de cáncer de pulmón estudiadas

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES

- Realizar ensayos con los fármacos y sus combinaciones en células sanas de pulmón para determinar efectos adversos.
- Aumentar el número de ensayos para obtener una “n” más representativa y datos más confiables.
- Realizar un análisis cuantitativo por Western Blot de la expresión proteica del canal Eag-1 para corroborar los resultados con la expresión génica de mejor manera.
- Realizar un ensayo en el que se agregue estradiol en las células para obtener mejores respuestas con Y.
- Silenciar el canal Eag-1 en las células por medio de siRNAs para determinar si los efectos continúan en proliferación celular.
- Determinar por que vías de señalización está actuando Y sobre el canal Eag-1.
- Realizar ensayos con la combinación de X-Y para observar su efecto sobre la expresión génica y proteica del canal Eag-1.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, P., Rocha, M., Pineda, B., & Chávez, M. (2016). PCR en Tiempo Real. *Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología*, 175-201.
- Aibar, S., Celano, C., Chambi, M., Estrada, S., Gandur, N., & Gange, P. (2003). *Manual de enfermería oncológica*. Argentina: Instituto Nacional del Cáncer.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Ion Channels and the Electrical Properties of Membranes. En B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, & P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science.
- Al-Lazikani, B., Banerji, U., & Workman, P. (2012). Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. *Nature Biotechnology*, 1-13.
- Alonso, A., Cabezón, M., Sáez, M., & Lara, P. (Enero de 2004). *Cáncer de Pulmón*. Obtenido de BioCancer: <http://www.biocancer.com/journal/437/5-biologia-molecular>
- Alonso, M. (2008). *Epidemiología y factores de riesgo del cáncer pulmonar. Revisión de la literatura*. Obtenido de Medigraphic: <http://www.medigraphic.com/pdfs/residente/rr-2008/rr081d.pdf>
- American Cancer Society. (2011). *Global Cancer Facts & Figures 2nd Edition*. Obtenido de <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-027766.pdf>
- American Cancer Society. (12 de Junio de 2014). *Cancer in the twenty-first century*. Obtenido de American Cancer Society: <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/thehistoryofcancer/the-history-of-cancer-twenty-first-century-and-beyond>
- American Cancer Society. (11 de Diciembre de 2015). *¿Qué indican las estadísticas clave sobre el cáncer de pulmón?* Obtenido de American Cancer Society: <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdepulmonnomicrocitico->

celulasno/guiadetallada/cancer-de-pulmon-no-microcitico-celulas-no-pequenas-what-is-key-statistics

American Cancer Society. (5 de Enero de 2015). *Inhibidores de la aromataasa*. Obtenido de American Cancer Society: <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeseno/recursosadicionales/fragmentado/medicamentos-para-reducir-el-riesgo-de-cancer-de-seno-aromatase-inhibitors>

American Cancer Society. (25 de Noviembre de 2015). *Opciones de tratamiento por etapa para el cáncer de pulmón no microcítico*. Obtenido de American Cancer Society: <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdepulmonnomicrocitico-celulasno/guiadetallada/cancer-de-pulmon-no-microcitico-celulas-no-pequenas-treating-by-stage>

American Cancer Society. (9 de Septiembre de 2015). *Terapia hormonal para el cáncer de seno*. Obtenido de American Cancer Society: <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeseno/guiadetallada/cancer-de-seno-tratamiento-terapia-hormonal>

American Cancer Society. (27 de Enero de 2016). *Cáncer de origen primario*. Obtenido de <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002285-pdf.pdf>

American Cancer Society. (8 de Febrero de 2016). *What is non-small cell lung cancer?* Obtenido de American Cancer Society: <http://www.cancer.org/cancer/lungcancer-non-smallcell/detailedguide/non-small-cell-lung-cancer-what-is-non-small-cell-lung-cancer>

Araújo, L. (2008). ANÁLISIS DE LAS PRINCIPALES RUTAS DE IMPORTACIÓN Y EXPORTACIÓN NUCLEAR EN “ASPERGILLUS NIDULANS”. . Madrid, España.

Arcangeli, A., & Becchetti, A. (2015). Novel perspectives in cancer therapy: Targeting ion channels. *Drug Resistance Updates*, 11-19.

- Armour, A., & Watkins, C. (2010). The challenge of targeting EGFR: experience with gefitinib in nonsmall cell lung cancer. *European Respiratory Review*, 186-196.
- Asher, V., Sowter, H., Shaw, R., Bali, A., & Khan, R. (2010). Eag and HERG potassium channels as novel. *World Journal of Surgical Oncology*, 8-113.
- AstraZeneca. (13 de 07 de 2015). *IRESSA® (gefitinib) approved by the U.S. Food and Drug Administration for first-line treatment of advanced EGFR mutation-positive non-small cell lung cancer*. Obtenido de AstraZeneca: <http://www.astrazeneca-us.com/media/press-releases/Article/20150713-iressa-approved-by-the-fda>
- ATCC. (2014). *A549*. Obtenido de American Type Culture Collection: <http://www.atcc.org/products/all/CCL-185.aspx#generalinformation>
- Barsotti, A., Ryskin, M., Kung, P., Verhelle, D., & Rollins, R. (2015). EZH2 as a therapeutic target in solid tumors. *Cancer Cell & Microenvironment*, 1-10.
- Bautista, D., Prieto, E., Martínez, M., Fernández, R., Hita, A., & Gastelu, C. (2010). *Perfil mutacional de los carcinomas pulmonares no microcíticos diagnosticados en el Hospital Carlos Haya de Málaga*. Obtenido de División española de la International Academy of Pathology: <http://docplayer.es/1327406-Perfil-mutacional-de-los-carcinomas-pulmonares-no-microcíticos-diagnosticados-en-el-hospital-carlos-haya-de-malaga.html>
- Beers, M., & Berkow, R. (s.f.). *Manual Merck de Geriátria. Trastornos Hematológicos y Cáncer*. Obtenido de Univadis: http://www2.univadis.net/opencms5/opencms/manual_geriatria/9/Cap_072
- Blaya, B., Nicolau, F., Jangi, S., Ortega, I., Alonso, E., Burgos, J., . . . Boyano, M. (2010). Histamine and Histamine Receptor Antagonists in Cancer Biology. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, 146-157.
- Camacho, J. (2006). Ether a` go-go potassium channels and cancer. *Cancer Letters*, 1-9.

- Cancer.Net. (Agosto de 2015). *Cáncer de pulmón - células no pequeñas: Diagnóstico*. Obtenido de Cancer.Net: <http://www.cancer.net/es/tipos-de-cancer/cancer-de-pulmon-celulas-no-pequenas/diagnostico>
- Cancer.Net. (Junio de 2015). *Comprensión de los costos relacionados con la atención del cáncer*. Obtenido de Cancer.Net: <http://www.cancer.net/es/desplazarse-por-atencion-del-cancer/consideraciones-financieras/comprendiendo-de-los-costos-relacionados-con-la-atencion-del-cancer>
- Cancer.Net. (2015). *Qué es la quimioterapia*. Obtenido de Cancer. Net: <http://www.cancer.net/es/desplazarse-por-atencion-del-cancer/como-se-trata-el-cancer/quimioterapia/que-es-la-quimioterapia>
- Carlson, R. (2005). The History and Mechanism of Action of Fulvestrant. *Clinical Breast Cancer*, 5-8.
- Castro, C., Cardona, A. F., Revéiz, L., Serrano, S. J., Carranza, H., Vargas, C. A., . . . Otero, J. M. (2010). Cáncer de pulmón de célula no pequeña metastásico. Tratamiento actual basado en la evidencia* (ONCOLGroup). *Redalyc*, 53-81.
- CDC. (27 de Enero de 2015). *Control del cáncer a nivel internacional*. Obtenido de Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades: <http://www.cdc.gov/spanish/cancer/international/statistics.htm>
- Cebollero, P., & Iridoy, A. (Febrero de 2015). *Enfermedades profesionales de naturaleza respiratoria. Cáncer de pulmón*. Obtenido de Gobierno de España. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.: <http://www.insht.es/InshtWeb/DDC%20RES-02.pdf>
- Chávez, M., Hernández, E., Vázquez, A., Gariglio, P., & Camacho, J. (2014). Antiproliferative and Proapoptotic Effects of Astemizole on Cervical Cancer Cells. *Int J Gynecol Cancer*, 824-828.

- Chávez, M., Pérez, J., Zuñiga, V., Díaz, J., Herrera, L., Haydee, C., . . . Camacho, J. (2015). Astemizole-based anticancer therapy for hepatocellular carcinoma (HCC), and Eag1 channels as potential early-stage markers of HCC. *Tumor Biology* , 6149-6158.
- Chemocare. (2016). *Fulvestrant*. Obtenido de Chemocare: <http://www.chemocare.com/es/chemotherapy/drug-info/fulvestrant.aspx>
- Chen, Y. (03 de 2010). Subcellular localization of Kv10.1 (Eag1): functional ion channels on the inner nuclear membrane. Ningde, China.
- Chou, J.-Y., Lai, S.-Y., Pan, S.-L., Jow, G.-M., Chern, J.-W., & Guh, J.-H. (2003). Investigation of anticancer mechanism of thiadiazole-based compound in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Biochemical Pharmacology*, 115-124.
- Cohen, J., & Khalili, F. (29 de Mayo de 2013). *Case Study: Structure of Ion Channels*. Obtenido de Theoretical and Computational Biophysics Group: <http://www.ks.uiuc.edu/Training/CaseStudies/pdfs/channels.pdf>
- Cueva, P., Delgado, C., & Muñoz, R. (2014). Incidencia del Cáncer de Pulmón. *Cáncer de Pulmón*, 2-3. Obtenido de SOLCA, Núcleo de Quito.
- Díaz, L., Ceja, I., Restrepo, I., Larrea, F., Avila, E., García, R., . . . Gamboa, A. (2009). Estrogens and Human Papilloma Virus Oncogenes Regulate Human Ether-a`-go-go-1 Potassium Channel Expression. *Cancer Research*, 3300-3307.
- Díaz, L., García, J., García, R., Santos, N., Barrera, D., Acila, E., . . . Fernando, L. (29 de Noviembre de 2012). *El astemizol sinergiza los efectos antiproliferativos del calcitrol: Una nueva estrategia para el tratamiento del cáncer de mamá*. Obtenido de Cámara Nacional de la Industria Farmacéutica: http://www.canifarma.org.mx/descargables/00_eventos/MEMORIAS_PREMIO_CANIFARMA_2012.pdf

- DrugBank. (13 de Junio de 2005). *Astemizole*. Obtenido de DrugBank: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00637>
- DrugBank. (13 de Enero de 2005). *Fulvestrant*. Obtenido de DrugBank: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00947>
- DrugBank. (13 de Enero de 2005). *Gefitinib*. Obtenido de DrugBank: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00317>
- Eguino, A., Fernández, B., García, G., & García, J. (2005). Factores de riesgos para el cáncer de pulmón. En A. Eguino, B. Fernández, G. García, & J. García, *Cáncer de pulmón. Una guía práctica* (pág. 11). Madrid: Asociación Española Contra el Cáncer.
- Engleman, J., & Jänne, P. (2008). Mechanisms of Acquired Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*, 2895-2899.
- Espinoza, M. (2011). DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE *Calendula officinalis* SOBRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE MARCADORES TUMORALES EN CÁNCER DE PULMÓN.
- FDA. (4 de Marzo de 2015). *U.S. Food and Drug Administration*. Obtenido de La FDA amplía el uso aprobado del Opdivo para tratar el cáncer de pulmón: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/ComunicadosdePrensa/ucm436728.htm>
- Fischer, M., Paulussen, J., Kok, J., Van der Heijden, V., Mol, N., & Janssen, L. (1997). Effects of the anti-allergics astemizole and norastemizole on Fc RI receptor-mediated signal transduction processes. *European Journal of Pharmacology*, 97-105.
- García, A., Rodríguez, H., & Scull, R. (2011). Citotoxicidad de extractos de plantas medicinales sobre. *Revista Cubana de Farmacia*, 101-108.
- García, J., & Camacho, J. (2011). Astemizole: an Old Anti-histamine as a New Promising Anti-cancer Drug. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 307-314.

- García, J., García, R., Barrera, D., Santos, N., Avila, E., Ordaz, D., . . . Díaz, L. (2012). Astemizole Synergizes Calcitriol Antiproliferative Activity by Inhibiting CYP24A1 and Upregulating VDR: A Novel Approach for Breast Cancer Therapy. *PLOS ONE*, 1-14.
- García, J., García, R., Santos, N., Barrera, D., Ordaz, D., Avila, E., . . . Díaz, L. (2014). In vivo dual targeting of the oncogenic Ether-à-go-go-1 potassium channel by calcitriol and astemizole results in enhanced antineoplastic effects in breast tumors. *BMC Cancer*, 1-10.
- García, L., & Sibila, O. (2013). Mecanismos de defensa pulmonar. *Medicina respiratoria*, 15-24.
- GLOBOCAN. (2012). *World Health Organization*. Obtenido de Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
- Gomez, N., Tsuruta, F., Barreto, O., Hu, L., & Dolmetsch, R. (2006). The C Terminus of the L-Type Voltage-Gated Calcium Channel CaV1.2 Encodes a Transcription Factor. *Cell Press*, 591-606.
- González, C., Bruno, G., Salariato, O., Álvarez, C., Paganini, L., Vallejos, J., & Dieguez, A. (2012). Actualización de la estadificación del cáncer de pulmón. *Oncología*, 325-330.
- Granja, A. (2013). *Estudio electrofisiológico de los canales hERG en células tumorales de colon*. Valladolid.
- Gutiérrez, H., & De la Vara, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. México: Mc Grew-Hill Interamericana.
- Gutiérrez, H., & De la Vara, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. México: Mc Grew-Hill Interamericana.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. (2013). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 647,658.

- Hershberger, P., & Siegfried, J. (2012). Estrogen Receptor Signaling in Lung Cancer . *Cell Signaling & Molecular Targets in Cancer*, 191-210.
- Hershberger, P., Stabile, L., Kanterewicz, B., Rothstein, M., Gubish, C., Land, S., . . . Nichols, M. (2009). Estrogen receptor beta (ER-B) subtype-specific ligands increase transcription, p44/p42 mitogen activated protein kinase (MAPK) activation and growth in human non-small cell lung cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 102-109.
- Hill, B. (2014). Etiology of Cancer. En A. Singh, & B. Damato, *Clinical Ophthalmic Oncology* (págs. 13-19). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Hsu, Y.-I., Kuo, P.-I., & Lin, C.-C. (2004). Proliferative inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by ursolic acid in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Life Sciences*, 2303-2316.
- Huang, X., & Yeh, L. (2014). Targeting potassium channels in cancer. *THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY*, 151-162.
- Hutcheson, I., Goddard, L., Barrow, D., McClelland, R., Francies, H., Knowlden, J., . . . Gee, J. (2011). Fulvestrant-induced expression of ErbB3 and ErbB4 receptors sensitizes oestrogen receptor-positive breast cancer cells to heregulin b1. *Breast Cancer*, 1-15.
- IASLC. (6 de Septiembre de 2015). *About Lung Cancer. Lung Cancer Patients/Survivors: Free Attendance to the World Conference 2015 in Denver, CO, Sept 6-9*. Obtenido de International Association for the Study of Lung Cancer: <https://www.iaslc.org/about-lung-cancer>
- INEC. (2011). *Cáncer*. Obtenido de Instituto Nacional de Estadística y Censos: <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Infografias/infocancer.pdf>
- Instituto Nacional del Cáncer. (9 de Febrero de 2015). *¿Qué es el cáncer?* Obtenido de Instituto Nacional del Cáncer: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>

- Instituto Nacional del Cáncer. (22 de Mayo de 2015). *Cáncer de pulmón de células no pequeñas: Tratamiento (PDQ®)*. Obtenido de Instituto Nacional del Cáncer: <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/pulmon/paciente/tratamiento-pulmon-celulas-no-pequenas-pdq>
- Instituto Nacional del Cáncer. (29 de Abril de 2015). *Tipos de tratamiento*. Obtenido de <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos>
- Isla, D., Lastra, R., Aguirre, E., Ortega, E., Lambea, J., & Andrés, R. (Julio de 2005). Abordaje terapéutico del carcinoma de pulmón no microcítico avanzado: ¿estamos "avanzando"? *Oncología (Barc.)* v.28 n.7 Madrid, 311-320. Obtenido de SciELO: http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=s0378-48352005000700002&script=sci_arttext#top10
- Jie, Q., Darshika, N., Yuan, X., He, G., Chen, M., Xu, S., & Wu, Y. (2015). Anti-allergic and anti-inflammatory properties of potent histamine H1 receptor antagonist, desloratadine citrate disodium injection, and its anti-inflammatory mechanism on EA.hy926 endothelial cells. *European Journal of Pharmacology*, 1-10.
- Jiménez, L., Zúñiga, J., & Ramírez, G. (2009). REVISTA DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS. *REVISTA DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS*, 304-315.
- Kajatt, A. (2013). Cáncer de pulmón, una revisión sobre el conocimiento actual, métodos diagnósticos y perspectivas terapéuticas. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 30(1):85-92.
- Kong, X., Chen, L., Jiao, L., Jiang, X., Lian, F., Lu, J., . . . Luo, C. (2014). Astemizole Arrests the Proliferation of Cancer Cells by Disrupting the EZH2-EED Interaction of Polycomb Repressive Complex 2. *Journal of Medicinal Chemistry*, 9512-9521.
- Krypuy, M., Newnham, G., Thomas, D., Conron, M., & Dobrovic, A. (2006). Alta resolución de fusión para el análisis rápido y sensible que la detección de mutaciones en muestras clínicas: KRAS codón 12 y 13 de mutaciones en células no pequeñas de cáncer de pulmón. *BMC Cancer*, 295.

- Li, M., & Xiong, Z.-G. (2011). Ion channels as targets for cancer therapy. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 156-166.
- Loose, D., & Stancel, G. (2012). Estrógenos y Progestágenos. En L. Bruton, *Las Bases farmacológicas de la terapéutica* (pág. 1173). California: McGraw Hill.
- Lung Cancer Alliance. (2016). *Types of Lung Cancer*. Obtenido de Lung Cancer Alliance: <http://www.lungcanceralliance.org/get-information/types-of-lung-cancer.html>
- Lungcancer. (2016). *Types and Staging of Lung Cancer*. Obtenido de lungcancer: http://www.lungcancer.org/find_information/publications/163-lung_cancer_101/268-types_and_staging
- Martínez, M. (2004). Los canales iónicos: la biología y patología. *Archivos de Cardiología de México*, S205-S210.
- MedlinePlus. (2 de Febrero de 2016). *Cáncer pulmonar*. Obtenido de MedlinePlus: <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/007270.htm>
- Medmol. (11 de 11 de 2007). *Apoptosis*. Obtenido de Medicina Molecular FIBAO: <http://medmol.es/glosario/60/>
- Moctezuma, C., & Patiño, M. (2009). *Cáncer de pulmón*. (G. Vunjak-Novakovic, & R. I. Freshney, Edits.) Obtenido de Mediographic. Literatura Biomédica: <http://www.medigraphic.com/pdfs/anaradmex/arm-2009/arm091e.pdf>
- National Cancer Institute. (2008). Tratamiento. En National Cancer Institute, *Lo Que Usted Necesita Saber Sobre El Cáncer de Pulmón* (pág. 17). Rockville: National Cancer Institute.
- National Cancer Institute. (Enero de 2011). *Cancer Prevalence and Cost of Care Projections*. Obtenido de National Cancer Institute: <https://costprojections.cancer.gov/>
- National Cancer Institute. (25 de Abril de 2014). *Terapias dirigidas contra el cáncer*. Obtenido de National Cancer Institute:

<http://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/terapia-dirigida/hoja-informativa-terapias-dirigidas>

National Cancer Institute. (18 de Agosto de 2015). *Con la aprobación de la FDA, el gefitinib regresa al mercado de EE. UU. para algunos pacientes con cáncer de pulmón.* Obtenido de National Cancer Institute: <http://www.cancer.gov/espanol/noticias/temas-y-relatos-blog/2015/fda-gefitinib>

National Cancer Institute. (s.f.). *Estadísticas del cáncer.* Obtenido de National Cancer Institute: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es/estadisticas>

Nguyen, T., Tran, E., Nguyen, T., Do, P., Huynh, T., & Huynh, H. (2004). The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition. *Carcinogenesis*, 647-659.

Okubo, S., Kurebayashi, J., Otsuki, T., Yamamoto, Y., Tanaka, K., & Sonoo, H. (2004). Additive antitumour effect of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor gefitinib (Iressa, ZD1839) and the antioestrogen fulvestrant (Faslodex, ICI 182,780) in breast cancer cells. *British Journal of Cancer*, 236-244.

OMS. (1 de Abril de 2008). *¿Aumenta o disminuye el número de casos de cáncer en el mundo?* Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <http://www.who.int/features/qa/15/es/>

OMS. (Febrero de 2015). *Cáncer.* Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

ONCOWEB. (10 de Diciembre de 2014). *La FDA acepta la solicitud de autorización de comercialización de gefitinib.* Obtenido de ONCOWEB: <http://www.oncowed.net/Prensa/V8462/La-FDA-acepta-la-solicitud-de-autorizacioacuten-de-comercializacioacuten-de-gefitinib.html>

OPS. (29 de Enero de 2014). *Epidemiología del Cáncer de pulmón en las Américas, 2014.* Obtenido de Organización Panamericana de la Salud:

http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22071&Itemid=270

Organización Panamericana de la Salud. (s.f.). *La carga económica de las enfermedades no transmisibles en la región de las Américas*.

Ortiz, C., Montante, D., Saqui, M., Hinojosa, L., Gamboa, A., Hernández, E., . . . Camacho, J. (2011). Eagl potassium channels as markers of cervical dysplasia. *Oncology Reports*, 1377-1383.

Osborne, C., Wakeling, A., & Nicholson, R. (2004). Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action. *British Journal of Cancer*, S2-S3.

Ouadid, H., & Ahidouch, A. (2013). K⁺ channels and cell cycle progression in tumor cells. *frontiers in PHYSIOLOGY*, 1-8.

Pardo, L., & Stühmer. (2014). The roles of K⁺ channels in cancer. *Nature Reviews*, 39-48.

Pardo, L., Contreras, C., Zientkowska, M., Alves, F., & Stümer, W. (2005). Role of Voltage-gated Potassium Channels in Cancer. *The Journal Membrane Biology*, 115-124.

Peralta, J. (2009). Rol del Potasio en la Actividad y Metabolismo Celular. *Rol del Potasio en la Actividad y Metabolismo Celular*, 1-32.

Pérez, E. (2016). *Extracción de ARN*. Obtenido de Biología Molecular WordPress.com:
<https://biologiamolecularinteractiva.wordpress.com/about/extraccion-de-arn/>

Piñeiro, L. (2003). Biología molecular y cáncer de pulmón. *Pneuma*, 135-138.

Pohl, H., Wheeler, J., & Murray, E. (2013). Sodium and Potassium in Health and Disease. *Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases*, 30-46.

Prevarskaya, N., Skryma, R., & Shuba, Y. (2010). Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 107-121.

- Probiotek. (2016). A549. Obtenido de Productos y equipos biotecnológicos : <http://www.probiotek.com/producto/a549gfp-cell-line/>
- Restrepo, I., Sánchez, C., & Camacho, J. (2011). Human EAG1 Potassium Channels in the Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Lung Cancer Cells. *Anticancer Research*, 1265-1270.
- Rodríguez, G. (10 de Octubre de 2010). *REQUISITOS DE LAS MUESTRAS PARA PCR EN TIEMPO REAL*. Obtenido de Servicio de Genómica del IIBM (SQP): <https://www.iib.uam.es/portal/documents/76122/76162/Requisitos+de+las+muestras+para+PCR+en+Tiempo+Real.pdf/1665d8b0-0d42-4dd5-a282-92aad8826df8>
- Rodríguez, G. (2016). Retrotranscripción de RNA. *Servicio de Genómica del IIBM*, 1.
- Rodríguez, J., Acuña, I., & Camacho, J. (2010). Eag1 Channels as Potential Cancer Biomarkers. *Sensors*, 5986-5995.
- Rodríguez, V., Saldaña, R., Mirabal, E., Vázquez, M., González, I., Cerbón, M., . . . Fortoul, T. (2015). Estrógenos y su influencia en el cáncer pulmonar. *Estrógenos y cáncer de pulmón*, 5-12.
- Salinas, A., Giménez, J., Serrano, L., Cha, S., & Sánchez, R. (2011). Papel de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) en el carcinoma de células renales esporádico. *Actas Urológicas Españolas*, 99-103.
- Salud. (16 de Abril de 2015). *El cáncer en el Ecuador*. Obtenido de Salud total: <https://www.saludsa.com/vivesaludtotal/index.php/cancer/el-cancer-en-el-ecuador/423-el-cancer-en-el-ecuador>
- Salvador, C. (2014). Pulmón. En P. Cueva, & J. Yépez, *Sociedad de Lucha Contra el Cáncer/Registro Nacional de Tumores. Epidemiología del Cáncer en Quito 2006-2010* (págs. 87-94). Quito: Areasistemas Cía Ltda.

- Satler, C., Walsh, E., Vesely, M., & Jacob, H. (1996). Novel missense mutation in the cyclic nucleotide-binding domain of HERG causes long QT syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, 27-35.
- Shen, H., Liu, J., Wang, R., Qian, X., Xu, R., Xu, T., . . . Shu, Y. (2014). Fulvestrant increases gefitinib sensitivity in non-small cell lung cancer cells by upregulating let-7c expression. *Biomedicina & Pharmacotherapy*, 307-313.
- Shen, H., Yuan, Y., Sun, J., Gao, W., & Shu, Y. (2010). Combined tamoxifen and gefitinib in non-small cell lung cancer shows antiproliferative effects. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 88-92.
- Shen, L., Li, Z., Shen, S., Niu, X., Yu, Y., Li, Z., . . . Lu, S. (2012). The synergistic effect of EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib in combination with aromatase inhibitor anastrozole in non-small cell lung cancer cell lines. *lungcancer*, 193-200.
- Siegfried, J., Gubish, C., Rothstein, M., Henry, C., & Stabile, L. (2012). Combining the Multitargeted Tyrosine Kinase Inhibitor Vandetanib with the Antiestrogen Fulvestrant Enhances Its Antitumor Effect in Non-small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 485-495.
- Society, A. C. (s.f.). *¿Qué indican las estadísticas clave sobre el cáncer de pulmón?*
 Obtenido de <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdepulmonmicrocitico-celulasno/guiadetallada/cancer-de-pulmon-no-microcitico-celulas-no-pequenas-what-is-key-statistics>
- Stabiel, L., & Siegfried, J. (2004). Estrogen Receptor Pathways in Lung Cancer. *Lung Cancer*, 259-267.
- Tamargo, J. (2004). Los poros y los canales iónicos regulan la actividad celular. *Actividad Celular*, 9-31.
- Tanca, J., & Arreaga, C. (2010). Incidencia del cáncer en Guayaquil 2003-2006. *Revista Oncológica*, 15-20.

- Thomas, A. (2005). Etiology of Cancer. En R. Marsh, & J. Samuel, *The Essentials of Clinical Oncology* (págs. 11-19). New Delhi: JAYPEE BROTHERS.
- Toyooka, S., Kiura, K., Mitsudomi, T., Kobayashi, S., Tenen, D., & Halmos, B. (2005). EGFR Mutation and Response of Lung Cancer to Gefitinib. *The New England Journal of Medicine*, 2136.
- Tracy, S., Mukohara, T., Hanse, M., Meyerson, M., Johnson, B., & Jänne, P. (2004). Gefitinib Induces Apoptosis in the EGFR(L858R) Non-Small-Cell Lung Cancer Cell Line H3255. *CANCER RESEARCH*, 7241-7244.
- Traynor, A., Shiller, J., Stabile, L., Kolesar, J., Eickhoff, J., Dacic, S., . . . Marcotte, S. S. (2009). Pilot study of gefitinib and fulvestrant in the treatment of post-menopausal women with advanced non-small cell lung cancer. *Lungcancer*, 51-59.
- Univerddad de Vigo. (03 de Marco de 2015). *Inmunocitoquímica*. Obtenido de Atlas de Histología Vegetal y Animal: <http://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/5-inmuno.php>
- Universidad Autónoma de Barcelona. (2016). *Nanodrop 1000*. Obtenido de Servei Genómica Bioinformàtica: <http://sct.uab.cat/genomica-bioinformatica/es/content/nanodrop-1000>
- Universidad de Buenos Aires. (2014). *Canales Iónicos*. Obtenido de Universidad de Buenos Aires: <http://www.odon.uba.ar/uacad/biofisica/general/apuntes/canales>
- Urrego, D., Tomczak, A., Zahed, F., Stühmer, W., & Pardo, L. (2014). Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Philosophical transactions of the Royal Society* , 1-9.
- USC. (1 de Agosto de 2015). *Cáncer pulmonar de células no pequeñas*. Obtenido de University of Southern California: <http://keckmedicine.adam.com/content.aspx?productId=118&pid=5&gid=007194>

- Vinaccia, S., Quiceno, J., Fernández, H., Contreras, F., Bedoya, M., Tobón, S., & Zapata, M. (2005). Calidad de vida, personalidad resistente y apoyo social percibido en pacientes con diagnóstico de cáncer pulmonar. *Redalyc*, 207-221. Obtenido de Invitrogen: www.invitrogen.com/cellculturebasics
- Wu, J., Zhong, D., Fu, X., Liu, Q., Kang, L., & Ding, Z. (2014). Silencing of Ether à Go-Go 1 by shRNA Inhibits Osteosarcoma Growth and Cell Cycle Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, 5570-5581.
- Wu, W., Dong, M., Wu, X., Sun, H., Tse, H., Lau, C., & Li, G. (2012). Human ether-à-go-go gene potassium channels are regulated by EGFR tyrosine kinase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 282-289.
- YouBioit. (14 de Septiembre de 2014). *Cómo funcionan los pulmones*. Obtenido de YouBioit: <http://www.youbioit.com/es/article/shared-information/23465/como-funcionan-los-pulmones>
- Zhang, X., Díaz, M., & Yee, D. (2013). Fulvestrant regulates epidermal growth factor (EGF) family ligands to activate EGF receptor (EGFR) signaling in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 351-360.
- Zhou, Z., Vorperian, V., Gong, Q., Zhang, S., & January, C. (1999). Block of HERG Potassium Channels by the Antihistamine Astemizole and its Metabolites Desmethylastemizole and Norastemizole. *Cardiovascular Electrophysiology*, 836-843.