

# EXPRESIÓN DE KVI0.1 Y P53 EN CÉLULAS HELA Y SIHA RESISTENTES A CISPLATINO

## EXPRESSION OF KVI0.1 AND P53 IN HELA AND SIHA CELLS RESISTANT TO CISPLATIN

---

María Camila López C.<sup>1</sup>

María Catalina Rangel A.<sup>2</sup>

Sara Emilia Giraldo<sup>3</sup>

Josefa Rodríguez<sup>4</sup>

Yenny Yolanda Lozano J.<sup>5</sup>

---

### RESUMEN

El cáncer de cuello uterino es una de las patologías con mayor incidencia en mujeres. Su tratamiento incluye el uso del quimiofármaco cisplatino, aunque la resistencia a esta terapia convencional limita el éxito del tratamiento. Una de las aproximaciones para abordar esta problemática es mediante la evaluación de proteínas que permitan evidenciar el desarrollo de resistencia. Kvl0.1 y p53 son proteínas que han sido propuestas como biomarcadores de malignidad y resistencia en varios tipos de cáncer; sin embargo, se desconocen sus cambios de expresión en las líneas celulares de cáncer de cuello uterino con virus de papiloma humano (HeLa VPH-18 y SiHa VPH-16). Con este estudio, se pretende evaluar la

variación en la expresión de p53 y Kvl0.1 en líneas celulares de cáncer de cuello uterino durante el proceso de desarrollo de resistencia a cisplatino; de esta manera, se puede aportar al conocimiento sobre los mecanismos de respuesta de las células frente a quimiofármacos.

**Palabras claves:** cáncer de cuello uterino, resistencia a cisplatino, Kvl0.1, p53.

### ABSTRACT

Cervical cancer is one of the pathologies with greater incidence in women, its treatment includes the use of the chemotherapeutic drug cisplatin, where resistance to this conventional therapy limits the success of the treatment. One of the approaches to address this problem

---

<sup>1</sup>Universidad de La Salle, Programa de Biología, Facultad de Ciencias Básicas, Bogotá. Correo: mlopez30@unisalle.edu.co.

<sup>2</sup>Universidad de La Salle, Programa de Biología, Facultad de Ciencias Básicas, Bogotá. Correo: mrangel00@unisalle.edu.co.

<sup>3</sup>Universidad de La Salle, Facultad de Ciencias Básicas, Bogotá. Correo: sgiraldo@unisalle.edu.co

<sup>4</sup>Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Docente investigador.

<sup>5</sup>Universidad de La Salle, Facultad de Ciencias Básica, Bogotá, Colombia jylozano@unisalle.edu.co.

is through the evaluation of proteins that demonstrate the development of resistance. Kv10.1 and p53 are proteins that have been proposed as biomarkers of malignancy and resistance in several types of cancer; however, their expression changes in cervical cancer cell lines with human papilloma virus (HeLa HPV-18 and SiHa HPV-16) are unknown. This study aims to

evaluate the variation in the expression of p53 and Kv10.1 in cervical cancer cell lines during the process of developing cisplatin resistance; contributing to the knowledge about the response mechanisms of cells against chemo drugs.

**Keywords:** Cervical cáncer, Cisplatin resistance, Kv10.1, p53.

## INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el cáncer del cuello uterino es la causa más frecuente de morbilidad y mortalidad por cáncer ginecológico (Dávila, García y Álvarez, 2010). Es responsable de 250.000 muertes (Rakohomatenina *et al.*, 2016) y es el segundo más frecuente en las mujeres después del cáncer de mama (3). En Colombia, es la principal neoplasia maligna en mujeres, con aproximadamente 4.460 casos nuevos cada año, de los cuales 1.860 terminan en muerte (Pardo y Cendales, 2015).

Como parte del sistema de prevención y diagnóstico de esta enfermedad, en la población colombiana se han implementado las pruebas de tamizaje como la citología, pruebas de detección del ADN viral y estrategias de vacunación; sin embargo, el bajo impacto de los programas de tamizaje, asociado a la poca participación de las mujeres, derivan en una alta incidencia de casos en estadios avanzados (Gamboa y Murillo, 2016). Ello ha favorecido a que el cáncer de cuello uterino continúe siendo un problema de salud pública en nuestro país.

Se han hecho recientes avances en el estudio de las características distintivas que facilitan la detección del cáncer, como son la señalización proliferativa, la evasión de los supresores de crecimiento, la activación de invasión y metástasis, la replicación "inmortal", la inducción de angiogénesis y resistencia a la muerte celular (Hanahan y Weinberg, 2016). No obstante, el incremento del cáncer como un problema de salud pública ha generado un creciente interés por encontrar marcadores que permitan diagnosticar el cáncer de manera temprana y predecir su progresión, con la finalidad de mejorar el abordaje terapéutico.

Para el caso del cáncer de cuello uterino, el tratamiento depende del estadio en el que se diagnostique, la edad de la paciente y su deseo de preservar o no la fertilidad. En etapas tempranas, el tratamiento estándar inicia con un procedimiento quirúrgico de citoreducción (Serman, 2002), seguido de quimioterapia, basada en cisplatino, y radioterapia, de manera concomitante (Ramahan *et al.*, 2009; Ozols, 2006). Se ha registrado que, posterior al tratamiento, un tercio de las mujeres desarrollan resistencia al quimiofármaco, al igual que la totalidad de las mujeres que presentan recurrencia de la enfermedad (Stewart *et al.*, 2006). Por lo tanto, el porcentaje de pacientes que se curan es bajo (Thigpen *et al.*, 1993; Hinojosa y Dueñas, 2000). Dado que la resistencia sobre las células tumorales es uno de los factores limitantes en el éxito terapéutico (Sakamoto, 2001), se ha descrito que el aumento de la resistencia al quimiofármaco se relaciona directamente con el estadio de progresión del tumor; debido a que las células cancerígenas adquieren alteraciones genéticas adicionales que les confieren ventajas de crecimiento a medida que proliferan. En consecuencia, no se produce el efecto citotóxico o citostático esperado (Hinojosa y Dueñas, 2000).

Con el objetivo de identificar a las pacientes que están desarrollando tumores resistentes a cisplatino y evitar un manejo terapéutico inadecuado, se buscan proteínas cuya expresión sea diferencial entre células sensibles y resistentes al tratamiento con cisplatino. Estas proteínas se proponen como biomarcadores de resistencia al quimiofármaco (Pérez, 1998; Frede *et al.*, 2013).

Las proteínas Kv10.1 y p53, respectivamente, se han propuesto como biomarcadores

de malignidad y resistencia a fármacos en distintos tipos de cáncer. En estos casos, p53 actúa como un regulador indirecto del canal Kv10.1. Por ello, esta investigación pretende conocer cómo varía la expresión de las proteínas Kv10.1 y p53 en las líneas celulares de cáncer de cuello uterino HeLa, infectada con el virus de papiloma humano genotipo 18 (VPH-18) y SiHa, línea infectada con VPH-16, durante el proceso de desarrollo de resistencia a cisplatino.

### CANAL DE POTASIO KV10.1

Los canales de potasio Kv10.1, también conocidos como KCNH1, son proteínas transmembranales voltaje dependientes. Su expresión se limita a ciertas áreas del cerebro como el hipotálamo, hipocampo y el córtex, además de encontrarse en pequeñas cantidades en el mioblasto y la placenta (Pardo et al., 2005; Martínez et al., 2015) y cuya sobreexpresión en cualquier tejido es indicativo de proliferación y transformación maligna (Martínez et al., 2015, Napp et al., 2005) debido a que están implicados en funciones importantes en las células tumorales como controlar la homeostasis celular, el potencial de membrana y otras señales que pueden estar asociadas en la biología del tumor. Así, promueven la angiogénesis, la capacidad de invasión, la diseminación metastásica y demás características de las células cancerígenas (Pardo y Stühmer, 2014; Prevarskaya, Skryma y Shuba, 2010).

El canal Kv10.1 se activa por cambios de voltaje, ya que transita de un estado abierto a cerrado (Pardo, 2004) y se encuentra expresado en una variedad de líneas celulares derivadas de tumores malignos y en muestras clínicas de diferentes tipos de cáncer (Pardo y Stühmer, 2008; Sakamoto

et al., 2001), tales como neuroblastomas, cáncer de seno, melanomas, cáncer de colon, de pulmones, y de ovario (Rodríguez-Rasgado, Acuña-Macías y Camacho, 2012).

Por otra parte, en pacientes con sarcomas de tejidos blandos, se demostró que la inhibición de la expresión de este canal ayudó a reducir la proliferación celular (Mello de Queiroz et al., 2006). Estudios realizados en células de cáncer de ovario resistentes a cisplatino con sobreexpresión de Kv10.1 demostraron que la inhibición del canal incrementó la muerte celular por la administración del quimio fármaco cisplatino. De este modo, dicho resultado sugiere que la inhibición de su expresión puede incrementar la sensibilidad a los tratamientos con cisplatino (Hui et al., 2015), por ende, podría ser un blanco de interés en distintos tipos de cáncer, debido a su potencial como biomarcador (Wadhwa et al., 2009; Stühmer, 2017).

Stewart et al. (2006) mencionan que las proteínas involucradas en transportes de iones, específicamente los canales iónicos como Kv10.1, pueden jugar un papel importante en la regulación o balance de la concentración de cisplatino en las células, lo que puede generar un fenotipo resistente o sensible al tratamiento.

Una idea similar se planteó por Fuertes et al. (2003), donde se postuló la hipótesis que describe la entrada de cisplatino a la célula mediante distintos canales transmembranales. Por lo tanto, los canales iónicos desempeñarían un papel importante en el diagnóstico de resistencia a quimio fármacos. También se ha demostrado que Kv10.1 cumple un rol importante en la inducción de apoptosis, debido a que

modulan el flujo de entrada y salida de iones K<sup>+</sup> en la célula.

La salida de iones K<sup>+</sup> reduce el volumen celular; lo que promueve la apoptosis. Por el contrario, el ingreso de iones K<sup>+</sup> la contrarresta (Lang *et al.* 1998); por lo tanto, la variación en la expresión de canales de potasio y, por ende, el flujo de iones, afectan la eficacia de los agentes quimioterapéuticos proapoptóticos como el cisplatino (Marklund, Henriksson y Grankvist, 2001).

La expresión de la proteína Kv10.1 está controlada por el factor de crecimiento E2F1 que, además, está indirectamente controlada por el gen p53 (Ouaïd-Ahidouch, Ahidouch y Pardo, 2016), el cual es un determinante directo de quimiosensibilidad a medicamentos como cisplatino (Righetti *et al.*, 1996) y, por consiguiente, la sobre expresión de la proteína Kv10.1 podría estar implicada en la expresión anormal de la proteína p53, codificada por el gen p53.

## PROTEÍNA P53

La proteína p53 se ha visto implicada en la transformación y regulación del ciclo celular; además, puede tener un papel en la inhibición de la síntesis de ADN, que sigue al daño del ADN en células tumorales. p53 es una fosfoproteína, cuya activación se debe al estrés celular (hipoxia, daño del ADN por radiación y quimioterapéuticos, entre otros y sobreexpresión de oncogenes). Su respuesta está direccionada a reparar el ADN y generar senescencia y apoptosis para prevenir una proliferación celular inapropiada (Bai y Zhu, 2006).

Esta fosfoproteína está codificada por el gen p53, un gen antitumoral encargado de

controlar la muerte celular al detectarse daños en el ADN. Se ha demostrado que la gran mayoría de tipos de cáncer se producen gracias a mutaciones en este gen. Dichas mutaciones en cáncer de cuello uterino y de ovario, por ejemplo, causan una alteración de la proteína p53, que desencadena un fenotipo resistente a cisplatino con progresión de la enfermedad (Perego *et al.*, 1996). Este resultado se debe a que p53 repara el daño inducido por el quimiofármaco, y actúa como un regulador transcripcional que incrementa la eficiencia de reparación y reduce el efecto citotóxico sobre el ADN dañado (Righetti *et al.*, 1996; Bai y Zhu, 2006; Perego *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1993).

Las mutaciones en el gen p53 se han encontrado en distintas líneas celulares, que incluyen cáncer de cuello uterino. Específicamente, se han descrito mutaciones puntuales en los codones 273 y 245 (Scheffner; Münger, Byrne y Howley, 1991); además, dos mutaciones en los codones 270 y 282 del exón 8, en líneas celulares resistentes a cisplatino (Righetti *et al.*, 1999). Estudios de Perego *et al.* (1996) demostraron que las mutaciones en el gen p53 alteran la expresión de la proteína p53 y resultan en el desarrollo de resistencia a cisplatino. Además de esto, se detectó una disminución en la expresión de la proteína p53 en 5 tumores en ausencia de mutaciones. Ello demuestra una correlación significativa entre la reducción de p53, el tipo de mutación y la respuesta patológica a la terapia basada en cisplatino, lo que permite concluir que la proteína p53 puede ser usada como un determinante de quimiosensibilidad en cáncer de cuello uterino (Righetti *et al.*, 1996).

Adicionalmente, se ha demostrado una relación entre la presencia del virus de

papiloma humano con la mutación del gen p53, debido a que la presencia de este virus induce a la expresión de las proteínas víricas E6 y E7, las cuales afectan directamente a los oncogénos p53 y retinoblastoma (Rb). Principalmente, la proteína E6 se asocia a p53, induciendo su degradación mediante ubiquitinación además de degradar la proteína pro-apoptótica BAK, lo cual resulta en resistencia a la apoptosis y un aumento en la inestabilidad cromosómica. Por este motivo, al estar expresados los genes E6 y E7 y sus respectivas proteínas, se obtiene una inmortalización en las células de distintos tejidos, al igual que una alteración en la expresión de las proteínas Kv10.1 y p53 (Stühmer, 2017; Hausen, 2002) resultado que demuestra la importancia de estudiar estas dos proteínas durante el proceso de resistencia a cisplatino en líneas celulares VPH positivo.

## CONCLUSIONES

La expresión del canal Kv10.1 en células cancerígenas está directamente relacionada con la proteína p53, frecuentemente alterada en células tumorales. Diferentes estudios han demostrado la relación directa entre la expresión alterada de p53 y la resistencia a distintos medicamentos, incluyendo cisplatino. Estos resultados sugieren que p53 podría ser usado como un biomarcador para determinar la quimio sensibilidad, al igual que Kv10.1 al estar indirectamente relacionadas entre sí.

Con este trabajo, se pretende iniciar una línea de investigación que aporte al conocimiento sobre la variación de la expresión de proteínas indicadores de resistencia a cisplatino, debido a que este quimiofármaco es usado como tratamiento de primera línea en pacientes

diagnosticados con cáncer de cuello uterino. Con el estudio de estas proteínas, se busca que la detección de un incremento en la expresión de Kv10.1 y p53 pueda utilizarse como biomarcador de diagnóstico o pronóstico en pacientes con cáncer de cuello uterino.

Adicionalmente, se aportará información relevante sobre el comportamiento de un gen antitumoral que ha sido de gran interés dentro de la comunidad científica y hacia el cual se han dirigido la atención para ser utilizado como diana en las terapias génicas.

## REFERENCIAS

- Bai, L. & Zhu, W-G. (2006). p53: structure, function and therapeutic applications. *Journal of Cancer Molecules*, 2(4), 141-153.
- Brown R. et al. (1993) Increased accumulation of p53 protein in cisplatin-resistant ovarian cell lines. *International Journal of Cancer*, 55(4), 678-684.
- Dávila, H. García, A., Álvarez, F. (2010). Cáncer de cuello uterino. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 36(4), 603-612.
- Frede J. et al. (2013) Ovarian cancer: Ion channel and aquaporin expression as novel targets of clinical potential. *European Journal of Cancer*, 49(10), 2331-2344.
- Fuertes, M., Castilla, J., Alonso, C. y Pérez, J. (2003). Cisplatin biochemical mechanism of action: from cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic

- and necrotic pathways. *Current Medicinal Chemistry*, 10(3),257-266.
- Gamboa O., Murillo R. (2016). Estimación de la carga económica de las lesiones preneoplásicas y el cáncer de cuello uterino en Colombia. Implicaciones para la vacunación contra el VPH. *Revista Colombiana de Cancerología*, 20(2), 61-72.
- Hanahan, D., Weinberg, R. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
- Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews: Cancer*, 2(5), 342-350.
- Hinojosa, L. & Dueñas, A. (2000) Papel de la quimioterapia en el tratamiento del carcinoma cervicouterino. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología*, 46(1), 47-57.
- Hui, C., Lan, Z., Yue-li, L., Li-lin, H. & Li-lin, H. (2015). Knockdown of eag1 expression by rna interference increases chemosensitivity to cisplatin in ovarian cancer cells. *Reproductive Sciences*, 22(12),1618-1626.
- Lang, F., et al. (1998). Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiological Reviews*, 78(1):247-306.
- Marklund, L., Henriksson, R. y Grankvist, K. (2001). Cisplatin-induced apoptosis of mesothelioma cells is affected by potassium ion flux modulator amphotericin B and bumetanide. *International Journal of Cancer*, 93(4), 577-583.
- Martínez, R. et al. (2015). Analysis of the expression of Kv10.1 potassium channel in patients with brain metastases and glioblastoma multiforme: impact on survival. *BMC Cancer*, 15, 839.
- Mello de Queiroz F., Suárez-Kurtz, G., Stühmer, W. & Pardo, L. (2006). Ether à go-go potassium channel expression in soft tissue sarcoma patients. *Molecular Cancer*, 5, 42.
- Napp, J., Monje, F., Stühmer, W. & Pardo, L. (2005) Glycosylation of Eag1 (Kv10.1) potassium channels: intracellular trafficking and functional consequences. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(33), 29506-29512.
- Ouadid-Ahidouch, H, Ahidouch, A. & Pardo, L. (2016) Kv10.1 K<sup>+</sup> channel: from physiology to cancer. *Pflügers Archive: European Journal of Physiology*, 468(5), 751-762.
- Ozols, R. (2006) Systemic Therapy for Ovarian Cancer: Current Status and New Treatments. *Seminars in Oncology*, 33(2), 3-11.
- Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application | Nature Reviews Cancer. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrc7984>.
- Pardo, C. & Cendales, R. (2015). *Incidencia, mortalidad y prevalencia de cáncer en Colombia 2007-2011*. Bogotá, D.C.: Instituto Nacional de Cancerología, ESE .
- Pardo, L. & Stühmer W. (2014). The roles of K<sup>+</sup> channels in cancer. *Nature Reviews: Cancer*, 14(1):39.

- Pardo, L. & Stühmer, W. (2008) Eag1: An Emerging Oncological Target. *Cancer Research*, 68(6), 1611–1613.
- Pardo, L. (2004). Voltage-gated potassium channels in cell proliferation. *Physiology*, 19, 285–292.
- Pardo, L., Contreras-Jurado, C., Zientkowska, M., Alves, F. & Stühmer, W. (2005). Role of voltage-gated potassium channels in cancer. *The Journal of Membrane Biology*, 205(3), 115-124.
- Perego, P. et al. (1996) Association between cisplatin resistance and mutation of p53 gene and reduced bax expression in ovarian carcinoma cell systems. *Cancer Research*, 56(3), 556-562.
- Pérez, R. (1998). Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *European Journal of Cancer*, 34(10), 1535-1542.
- Prevarskaya, N., Skryma, R. y Shuba, Y. (2010) Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 16(3), 107-121.
- Rahaman, J., Steiner, N., Hayes, M., Chuang, L., Fishman, D. & Gretz, H. (2009) Chemotherapy for Gynecologic Cancers. *The Mount Sinai Journal of Medicine*, 76(6), 577-588.
- Rakotomahenina, H., Bonneau, C., Ramanah, R., Rouzier, R., Bru, J. & Riethmuller, D. (2016). Epidemiología, prevención y detección precoz del cáncer de cuello uterino. *EMC- Ginecología-Obstetricia*, 52(3), 1-13.
- Righetti, S. et al. (1996). A comparative study of p53 gene mutations, protein accumulation, and response to cisplatin-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma. *Cancer Research*, 56(4), 689-693.
- Righetti, S., Perego, P., Corna, E., Pierotti, M., Zunino, F. (1999). Emergence of p53 mutant cisplatin-resistant ovarian carcinoma cells following drug exposure: spontaneously mutant selection. *Cell Growth Differences*, 10(7), 473–478.
- Rodríguez-Rasgado J., Acuña-Macías I. & Camacho, J. (2012). Eag1 channels as potential cancer biomarkers. *Sensors*, 12(5), 5986-5995.
- Sakamoto M., et al. (2001) Analysis of gene expression profiles associated with cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines and tissues using cDNA microarray. *Human Cell*, 14(4), 305-315.
- Scheffner, M., Münger, K., Byrne, J. & Howley, P. (1991). The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(13), 5523-5527.
- Serman, F. (2002) Cáncer cervicouterino: epidemiología, historia natural y rol del virus papiloma humano: perspectivas en prevención y tratamiento. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, 67(4), 318-323.
- Stewart, J., White, J., Jan, X. ... Lin, B. (2006). Proteins associated with Cisplatin resistance in ovarian cancer cells identified by quantitative proteomic technology and integrated with mRNA



- expression levels. *Molecular and Cellular Proteomics*, 5(3):433-443.
- Stühmer, W. (2017). El canal de potasio dependiente de voltaje Kv10.1 y el cáncer. *Revista Académica Colombiana de Ciencias Exactas Físicas y Naturales*, 41(160):274-280.
- Thigpen, J., Bertelsen, K., Eisenhauer, E., Hacker, N., Lund, B. & Sessa, C. (1993) Long-term follow-up of patients with advanced ovarian carcinoma treated with chemotherapy. *Annals of Oncology*, 4(4):35-40.
- Wadhwa, S., Wadhwa, P., Dinda, A. & Gupta, N. (2009). Differential expression of potassium ion channels in human renal cell carcinoma. *International Urology and Nephrology*, 41(2), 251-257.