



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA



**EFFECTO DE AMIODARONA Y DESETILAMIODARONA SOBRE  
LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA Y MIGRATORIA DE  
CÉLULAS PROVENIENTES DE CÁNCER DE PULMÓN**

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

PRESENTA

**ZURISADAI MORALES HERRERA**

DIRECTOR DE TESIS  
**DR. JOSÉ EVERARDO AVELINO CRUZ**

ASESOR DE TESIS  
**DR. EDUARDO MONJARAZ GUZMÁN**

Mayo, 2025

## ÍNDICE

1. ANTECEDENTES GENERALES .....	8
1.1. Cáncer.....	8
1.2. Cáncer de pulmón.....	12
1.2.1. Clasificación.....	12
1.2.2. Factores de riesgo.....	14
1.2.3. Sintomatología y diagnóstico .....	18
1.2.4. Tratamiento.....	19
1.3. Canales iónicos.....	20
1.3.1. Canales de potasio .....	22
1.3.2.1. Canal de potasio dependiente de voltaje miembro 1 de la subfamilia H.....	26
1.3.2.2. Canales de potasio dependiente de voltaje miembro 1 de la subfamilia H y cáncer    30	
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS .....	31
2.1. Amiodarona y desetilamiodarona.....	31
2.1.1. Amiodarona y cáncer.....	35
2.1.2. Desetilamiodarona y cáncer.....	36
3. JUSTIFICACIÓN.....	38
4. HIPÓTESIS.....	39
5. OBJETIVOS.....	39
5.1. Objetivo general .....	39
5.2. Objetivos específicos.....	39
6. METODOLOGÍA .....	40
6.1. Cultivo celular de la línea tumoral A549.....	40
6.1.1 Características de cultivo y mantenimiento de la línea celular A549.....	40
6.1.2. Tratamiento con amiodarona y desetilamiodarona.....	41
6.2. Ensayo de proliferación celular .....	41
6.3. Ensayo de migración .....	41
6.4. Ensayo de viabilidad mitocondrial .....	42
6.5. Ensayo de expresión génica (RT-PCR de punto final).....	43
6.6. Análisis estadístico .....	48
7. RESULTADOS .....	48
8. DISCUSIÓN.....	59

9. CONCLUSIONES .....	63
10. BIBLIOGRAFÍA .....	64

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT ) por la oportunidad y el apoyo otorgado mediante la beca como alumna de la Mestria en Ciencias Fisiológicas 1262326.

Gracias a la Vicerrectoria de Investigación y Estudios de Posgrados VIEP de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por el apoyo brindado para la culminación de este proyecto.

## AGRADECIMIENTOS

Con profundo reconocimiento, expreso mi gratitud al Dr. José Everardo Avelino Cruz por creer en mí, por sus conocimientos, sus valiosas sugerencias y apoyo constante.

Deseo asimismo expresar mi más profundo agradecimiento al D.C. Eduardo Monjaraz Guzmán, por su guía, sabiduría, paciencia y dedicación en este trabajo. Gracias por su tiempo y por los conocimientos brindados para llevar a cabo esta investigación.

Agradezco a Dios por esta oportunidad, por cada detalle a lo largo de este proyecto, por mostrar tu amor incondicional, por la sabiduría, alegrías, por tus bendiciones, fortaleza y guía. Por ser mi apoyo y ayuda en todo momento, sin ti no sería posible.

A mis padres y hermanos, gracias por siempre estar ahí, por su amor, sacrificios, trabajo, paciencia, ayuda para lograr llegar aquí.

A los miembros del laboratorio: Julieta, Sele, David, Max, Jaime, Eve, Rubén por compartir sus conocimientos, experiencias, sugerencias y aportaciones a esta investigación.

A mis amigos Diana, Jason, Sahian, Diego, Esteban por escucharme, compartir gratos momentos, por su apoyo incondicional.

A Ismael gracias por todo, por tu paciencia, ayuda, por animarme a seguir, gracias por cada momento de alegría y risa.

A todos gracias

## ABREVIATURAS

<b>AD</b>	Amiodarona
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>CaM</b>	Calmodulina
<b>CNBHD</b>	Dominio homólogo de unión a nucleótidos cíclicos
<b>DEA</b>	Desetilamiodarona
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>EGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
<b>EPOC</b>	Enfermedad obstructiva crónica
<b>ESMO</b>	Sociedad Europea de Medicina Oncológica
<b>EUA</b>	Estados Unidos de América
<b>FDA</b>	Administración de Medicamentos y Alimentos
<b>GLOBOCAN</b>	Observatorio Global del Cáncer
<b>INEGI</b>	Instituto Nacional de Estadística y Geografía (México)
<b>IRM</b>	Imágenes por resonancia magnética
<b>IUPAC</b>	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
<b>K2P</b>	Canales con dos dominios de poro
<b>KCNH1</b>	Canal de potasio dependiente de voltaje miembro 1 de la subfamilia H
<b>KGKC</b>	Canales de potasio dependientes de voltaje
<b>MT</b>	Mitotracker
<b>NAChR</b>	Receptores nicotínicos de acetilcolina
<b>NCI</b>	National Cancer Institute
<b>NSCLC</b>	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PAS</b>	Dominio N-terminal Per-Arnt-Sim
<b>PBS</b>	Solución salina tamponada con fosfato

<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PD</b>	Dominio del poro
<b>PGP</b>	Glicoproteína P
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
<b>SCLC</b>	Cáncer de pulmón de células pequeñas
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>TAE</b>	Tris acetato EDTA
<b>VGIC</b>	Canales iónicos dependientes de voltaje
<b>VSD</b>	Dominio sensor de voltaje

## RESUMEN

El cáncer de pulmón es la principal causa de incidencias y defunciones por cáncer a nivel mundial. En particular, el cáncer de pulmón de células no pequeñas representa el 80% de todos los casos de cáncer de pulmón, y se caracteriza por una respuesta reducida a la quimioterapia y radioterapia, lo que subraya la necesidad de desarrollar nuevos blancos farmacológicos para combatir eficazmente esta enfermedad.

El canal de potasio dependiente KCNH1 es un canal de potasio dependiente de voltaje, presente en prácticamente todas las células, y que está involucrado en múltiples funciones celulares, tales como proliferación y supervivencia. Análisis en bases bioinformáticas muestran que este canal está sobre-expresado en diversos tipos de tumores y ensayos funcionales revelaron su participación en diferentes funciones celulares, que incluye a la proliferación, apoptosis, angiogénesis, migración e invasión. Estas evidencias proponen a los canales KCNH1 como potenciales blancos moleculares para el tratamiento del cáncer.

Amiodarona (AD) y su metabolito activo, desetilamiodarona (DEA), bloquean los canales de potasio KCNH1, y son empleados comúnmente en la clínica, como fármacos antiarrítmicos clase III. A pesar de su uso principal en la cardiología, estudios sugieren que AD y DEA pudieran inhibir el potencial metastásico de las células cancerígenas, sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes a esta capacidad antitumoral aún no han sido completamente descritos.

El propósito del presente trabajo fue investigar si el bloqueo farmacológico de los canales KCNH1, utilizando AD y DEA, incidía negativamente en el potencial metastásico de la línea celular A549, provenientes de cáncer de pulmón de células no pequeñas, para lo cual, se evaluaron tres aspectos clave: proliferación, migración y viabilidad mitocondrial.

Los resultados mostraron que AD y DEA no afectan la capacidad migratoria de las células A549, pero sí tienen un impacto negativo sobre la capacidad proliferativa y la viabilidad mitocondrial de las células A549. A pesar de los resultados obtenidos, se requieren estudios adicionales para dilucidar los mecanismos moleculares precisos.

## **1. ANTECEDENTES GENERALES**

### **1.1. Cáncer**

La división celular es un proceso estrictamente controlado que garantiza el crecimiento y proliferación de células en función a las necesidades fisiológicas. Las células hijas construyen tejido nuevo o remplazan a las células que han muerto por daño o envejecimiento. Cuando este proceso no sigue un orden, es decir, cuando se pierde la regularización y secuencia de las fases del ciclo celular consecuentemente puede originarse cáncer (National Cancer Institute, 2024). Numerosos procesos celulares se ven alterados en las células tumorales, tales como el mantenimiento de una señalización proliferativa, la evasión a la acción de los supresores tumorales, reducción en su capacidad de muerte celular, entre otros (Hanahan, 2022). El cáncer se distingue por una proliferación de células atípicas que han evadido los sistemas de control interno (Krieghoff et al., 2017). No se observa una cascada lineal de eventos, sino más bien una serie de procesos concurrentes, parcialmente superpuestos (Suhail et al., 2019).

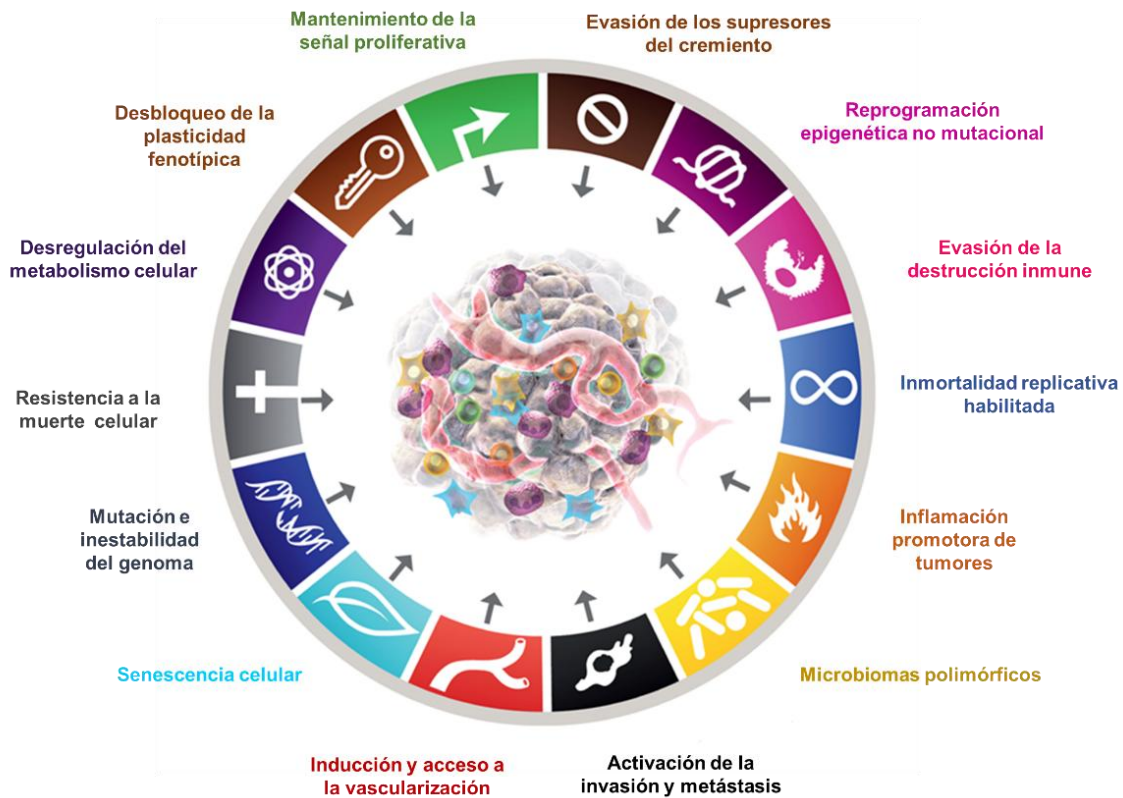
La Organización Mundial de la Salud (OMS) define cáncer como un conjunto de enfermedades que se pueden originar en casi cualquier órgano o tejido (pulmones, estómago, páncreas, hígado, piel, intestinos, mama, testículos, próstata, huesos, en sistema linfático, médula espinal, etc.) del cuerpo cuando células anormales crecen de forma descontrolada, sobrepasando límites habituales, produciendo metástasis y eventualmente diseminándose por todo el cuerpo (Organización Mundial de la salud, 2022). La metástasis, el resultado de dicho proceso, donde células cancerosas se separan del sitio donde se originaron (tumor primario), y migran por medio de la sangre o el sistema linfático para formar nuevos tumores en otros órganos o tejidos, proceso conocido como metástasis (National Cancer Institute, 2024).

#### **1.1.1. Características de células tumorales**

A pesar de la existencia de un amplio tipo de células tumorales, las células cancerígenas presentan características distintivas adquiridas (Figura 1), que promueven el paso de un estado normal a un crecimiento neoplásico (Hanahan, 2022):

- I. Mantenimiento de la señal proliferativa de manera crónica.
- II. Evasión de los supresores de crecimiento.

- III. Resistencia a la muerte celular.
- IV. Reprogramación epigenética no mutacional.
- V. Evasión a la destrucción por parte del sistema inmune.
- VI. Inmortalidad replicativa.
- VII. Inflamación promotora de tumores.
- VIII. Microbiomas polimórficos.
- IX. Activación de la invasión y metástasis.
- X. Inducción y acceso a la vasculatura.
- XI. Senescencia celular.
- XII. Mutación e inestabilidad del genoma.
- XIII. Resistencia a la muerte celular.
- XIV. Desregularización del metabolismo celular.
- XV. Desbloqueo de la plasticidad fenotípica.

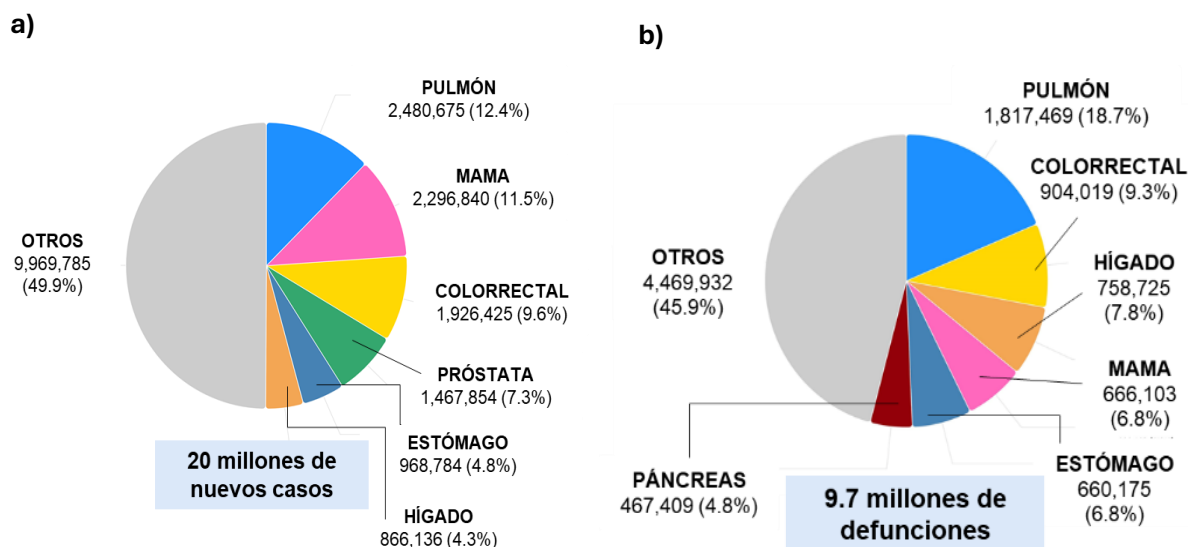


**Figura 1.** Características de las células cancerígenas (Modificado de Hanahan, 2022).

### 1.1.2. Epidemiología

El cáncer no es un problema de salud contemporáneo ni de tiempos modernos, existen reportes sobre casos de cáncer desde 5,000 años a.C. (Gallegos et al., 2020).

Las estadísticas muestran que, en el año 2022 a nivel mundial, se reportaron 20 millones de nuevos casos de cáncer, y la muerte de casi 10 millones de personas por este padecimiento, siendo más frecuente la mortalidad en hombres que en mujeres (OMS, 2022).



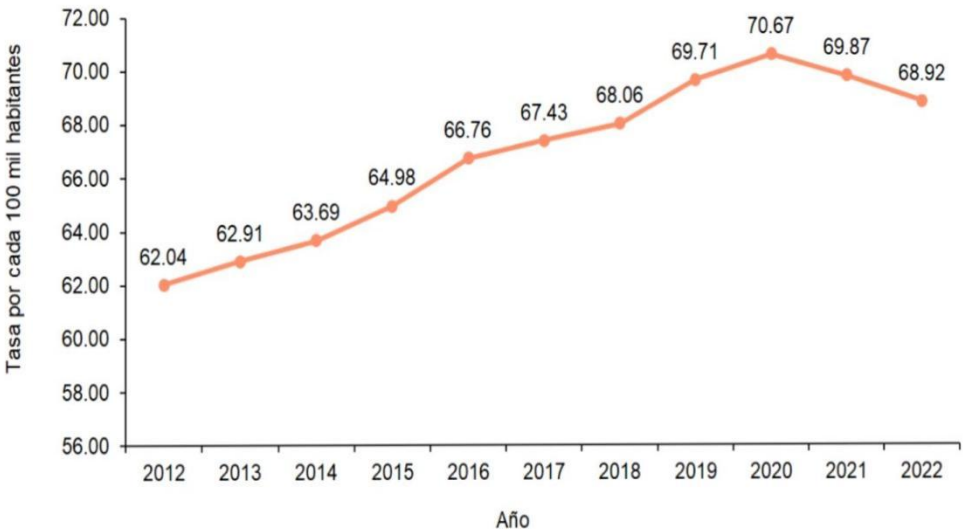
**Figura 2.** Datos estadísticos de la a) incidencia y b) mortalidad a nivel mundial de diferentes tipos de cáncer (ambos sexos y sin distinción de edad). (Modificado de GLOBOCAN, 2022).

Se ha proyectado que los pacientes diagnosticados con algún tipo de cáncer aumentarán aproximadamente 60% en tan solo 20 años, alcanzando los 30 millones de nuevos casos para 2040, presentándose una mayor incidencia en países de bajos y medianos ingresos, saturando los sistemas de salud pública (Organización Panamericana de la Salud/OMS, 2023).

Los tipos de cáncer más frecuentemente diagnosticados son los de mama, pulmón, colorrectal, próstata e hígado (OMS, 2022). Según las nuevas estimaciones disponibles en el Observatorio Mundial del Cáncer, el cáncer de pulmón fue el más frecuente en todo el mundo con 2.5 millones de nuevos casos, lo que representa el 12.4% del total de nuevos casos. El

cáncer de mama, detectado en mujeres, ocupó el segundo lugar (2.3 millones de casos; 11.6%), seguido del cáncer colorrectal (1.9 millones de casos; 9.6%), el cáncer de próstata (1.5 millones de casos; 7.3%) y el cáncer de estómago con 970,000 casos; correspondiente a 4.9% (GLOBOCAN, 2022).

A nivel nacional, de acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), en el año 2022 se reportaron 847,716 defunciones, donde el 10.6 % se debieron a tumores malignos. En México, se registraron alrededor de 207,154 casos de cáncer, donde aproximadamente el 46% de los pacientes fallecieron (GLOBOCAN, 2022). La tasa de mortalidad aumentó constantemente presentándose con mayor incidencia a partir de los 50 años de edad (sin distinción entre hombres y mujeres). Por ejemplo, entre los años 2012 y 2022 se ha observado un aumento en la tasa de mortalidad. En 2012, se reportaron 62.04 muertes por cada 100 mil personas. En contraste, en 2024 esta tasa incremento a 68.92 defunciones por cada 100 mil personas. Después de los 60 años de edad, el índice de letalidad es mayor en los hombres (INEGI, 2024).



**Figura 3.** Tasa de defunción por tumores malignos de 2012 a 2022 (muertes por cada 100 mil habitantes). (Modificado de INEGI, 2024).

Por otra parte, el INEGI en su última actualización del periodo de enero a marzo del 2024, registró 212,404 defunciones, donde los tumores malignos son responsables de 23,464 muertes, siendo 12,472 mujeres y 10,992 hombres (INEGI, 2024).

## **1.2. Cáncer de pulmón**

El cáncer de pulmón es uno de los cánceres diagnosticados con mayor frecuencia, se registraron aproximadamente 2 millones de casos nuevos, y 1.76 millones de muertes por año, siendo la principal causa de muertes relacionadas con el cáncer en todo el mundo (OMS, 2022).

A nivel nacional, ocurre una situación similar, datos aportados por el GLOBOCAN, señalan que, en el año 2022, el diagnóstico de cáncer en México es de 207,154 casos nuevos, y de los cuales 8,257 corresponden a casos de cáncer de pulmón, ocupando así el noveno lugar en incidencia, lo que representa el 4 % de los casos registrados en 2022 y el tercer lugar en mortalidad con 7,808 defunciones. (GLOBOCAN, 2022).

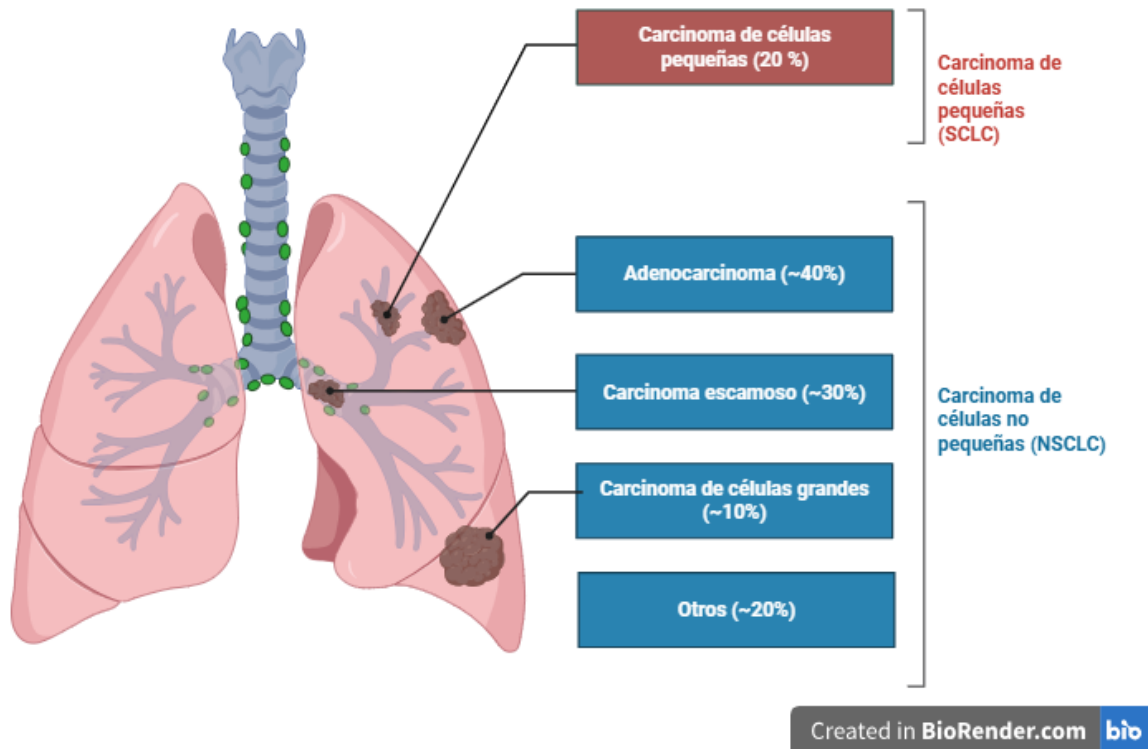
### **1.2.1. Clasificación**

El cáncer de pulmón se agrupa en dos tipos, de acuerdo con sus características histológicas: carcinoma de células pequeñas (20% de los casos) y carcinoma de células no pequeñas responsable del 80% de los casos. Ver figura 4. (Brett et al, 2020; Sánchez et al., 2019).

#### **1.2.1.1. Cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC)**

Es una neoplasia maligna agresiva con una proliferación acelerada, diseminación temprana y escasa supervivencia. Las células son pequeñas con núcleo denso, nucléolo discreto o ausente, con alta tasa proliferativa y necrosis frecuente (Dingemans et al., 2021).

Este tipo de cáncer se caracteriza por un crecimiento tumoral rápido y un potencial metastásico mayor, debido a ello el pronóstico es desalentador (Cabrera et al. 2023).



*Figura 4. Clasificación de cáncer de pulmón.*

#### 1.2.1.2. Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)

Este tipo de tumor presenta una buena respuesta inicial al tratamiento, pero al paso del tiempo la mayoría de los pacientes presentan quimiorresistencia, dando como consecuencia un aumento en la letalidad producida por esta patología (Rodríguez et al., 2017). Se origina en células especializadas en el recubrimiento del árbol bronquial, desde los bronquios hasta los alveolos. Alrededor del 80 % de los pacientes con NSCLC, son diagnosticados en etapas avanzadas (Alatorre et al., 2019; Cabrera et al. 2023).

Se divide principalmente en cuatro tipos (Singh, 2021; Zappa, 2016):

- **Adenocarcinoma:** subtipo predominante responsable de aproximadamente el 40 % de todos los tipos de cáncer de pulmón, es el más común en pacientes no fumadores y en mujeres (American Cancer Society, 2024). Es un tumor epitelial maligno pequeño con

diferenciación glandular, se desarrolla en los bronquios periféricos, a partir de neumocitos tipo II que cubre los alveolos pequeños. Donde hay producción de mucina detectable mediante tinción de mucina como mucicarmina o factor de transcripción tiroidea 1 (TTF1) o expresión de marcadores de neumocitos como napsina A (Travis, 2015). A diferencia del carcinoma de células escamosas, su crecimiento es menor, pero se propagan agresivamente y de manera extensa (Capitani et al., 2023; Romeo & Barreiro, 2023).

- **Carcinoma escamoso:** causante del 30 % de casos diagnosticados de todos los cánceres de pulmón, se origina en la zona central pulmonar comenzando de las células del epitelio estratificado que reviste desde la tráquea a los bronquios principales y está asociada con antecedentes de tabaquismo, especialmente entre los hombres. Estudios epidemiológicos revelan una disminución en la incidencia de esta neoplasia en los últimos años (National Cancer Institute, 2024; Romeo & Barreiro, 2023).
- **Carcinoma de células grandes:** ocurre en la parte proximal del tórax, se origina en las células epiteliales que reviste a los pulmones y comprende aproximadamente el 10 % de los casos (Romeo & Barreiro, 2023).
- **Otros subtipos:** El 20 % restante corresponde algunos otros subtipos de NSCLC que son menos comunes, como, carcinoma adenoescamoso y carcinoma sarcomatoide (American Cancer Society, 2024).

### 1.2.2. Factores de riesgo

Actualmente no se conoce con exactitud cuáles son las causas que originan el cáncer de pulmón, pero diversos factores pueden aumentar el riesgo del desarrollo de esta enfermedad (Figura 5). Entre los que se encuentran:

#### 1.2.2.1. Edad

El cáncer de pulmón se manifiesta principalmente en personas mayores. La mayoría de las personas diagnosticadas con cáncer de pulmón tienen o superan los 75 años; un número muy pequeño de personas diagnosticadas, sobre todo pacientes fumadores son menores de 55 años. La edad promedio donde se diagnostican mayores casos es de aproximadamente 70 años, debido a una acumulación de carcinógenos, existencia de enfermedades pulmonares crónicas,

características genéticas, susceptibilidad de cada individuo, etc. (Acosta et al., 2016; American Cancer Society, 2024; De Groot et al., 2018; Dubin et al., 2020).

#### **1.2.2.2. Factores genéticos**

Herbs (2008) identificó que un mecanismo para la supervivencia de células malignas es una modificación en la composición genética, por ejemplo, existen mutaciones en la línea germinal en p53, retinoblastoma, gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y otros genes (De Groot et al., 2018).

#### **1.2.2.3. Antecedentes familiares**

Diversas investigaciones han demostrado que un historial familiar positivo con cáncer aumenta el riesgo significativamente de cáncer de pulmón, aproximadamente un 50 %, en comparación con aquellos sin estos antecedentes (American Cancer Society, 2019; De Groot et al., 2018).

Los individuos fumadores y con un historial familiar asociado a cáncer tienen el doble de probabilidad de presentar esta enfermedad neoplásica; siendo adicionalmente elevado si múltiples familiares presentan esta patología o si dicho familiar es diagnosticado a temprana edad. En personas no fumadoras con un historial familiar con cáncer existe una probabilidad de 1.5 veces mayor a desarrollar cáncer (De Groot et al., 2018; Kanwal et al., 2017).

#### **1.2.2.4. Tabaquismo activo**

Más de 7000 sustancias químicas componen el humo del tabaco y sólo 60 de ellas están identificadas. Una exposición prolongada a estas toxinas altera mecanismos relacionados con el ADN y procesos genéticos que regulan el crecimiento generando diferentes enfermedades como cáncer (Comisión Nacional contra las adicciones, 2020; De Groot et al., 2018).

La nicotina activa receptores betaadrenérgicos y nicotínicos de acetilcolina (NACHR) en tejido canceroso y sano, conduce a la progresión de tumores de pulmón y resistencia a radioterapia y quimioterapia (De Groot et al., 2018; Warren et al., 2013).

#### **1.2.2.5. Tabaquismo pasivo**

Los hallazgos más recientes avalan que el humo de segunda mano puede aumentar considerablemente la probabilidad de padecer esta patología. Se ha demostrado que hay un aumento del 25 % del riesgo de desarrollar cáncer de pulmón al estar expuesto al humo de tabaco ambiental constantemente (American Cancer Society, 2024).

#### **1.2.2.6. Factores hormonales**

La incidencia mayor del cáncer de pulmón en mujeres principalmente no fumadoras se asocia a la activación de los receptores de estrógenos; dando como consecuencia aumento en la proliferación y crecimiento del tumor (Yin et al., 2020).

#### **1.2.2.7. Dieta y consumo de alcohol**

Una dieta incluyendo verduras que contienen isotiocianatos y carotenoides aporta protección contra el cáncer de pulmón. Mientras que debe evitarse el consumo elevado de carne roja y alimentos con elevadas cantidades de sodio, ya que produce N-nitrosaminas al cocinarse, que en el organismo causan daño en el ADN, mutaciones de K-Ras, P53 y puede desarrollarse esta anomalía (De Groot et al., 2018; Malhotra et al., 2016).

#### **1.2.2.8. Radón**

Se ha identificado niveles altos de radón en construcciones, minas subterráneas y sótanos; que es producido por la descomposición de uranio tanto en suelo como en rocas, causando daño en el ADN aumentando el riesgo de presentar cáncer de pulmón, principalmente entre no fumadores (American Cancer Society, 2019).

#### **1.2.2.9. Exposición laboral**

Las personas que laboran en minas, molinos, fábricas textiles y que están expuestas a sustancias cancerígenas como amianto (más común), arsénico, cadmio, berilio, níquel, sílice tienen una mayor probabilidad de presentar cáncer de pulmón, por lo que en estos últimos

años se han establecido medidas de seguridad para mitigar efectos adversos en la salud de los trabajadores (De Groot et al., 2018).

#### **1.2.2.10. Combustibles en cocina**

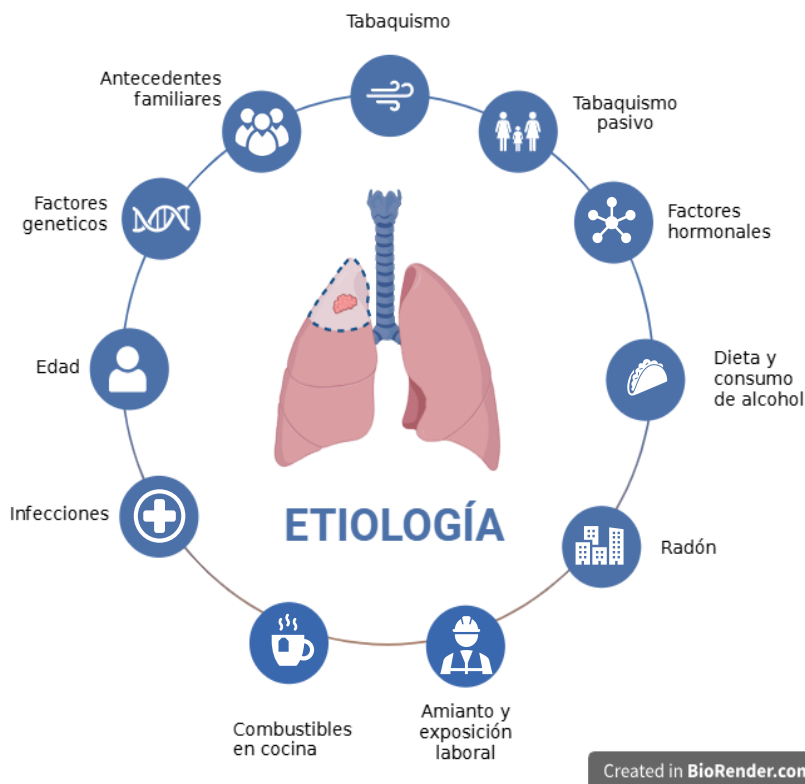
Al cocinar, los aceites que comúnmente se utilizan producen sustancias químicas, principalmente hidrocarburos policíclicos como el benzo(a)antraceno, 4-aminobifelino y el trans-trans-2,4-decadial, que pueden iniciar una alteración en el ciclo celular, mutaciones en el ADN, así mismo producen especies reactivas de oxígeno y por consiguiente un proceso canceroso ante una exposición prolongada, por lo que para disminuir la incidencia de este tipo de cáncer deberían implementar el calentamiento del aceite a baja temperatura y preferentemente en cocinas comerciales utilizar campanas de extracción en el área de cocción ( Jia et al., 2018; Xue et al., 2016).

#### **1.2.2.11. Enfermedades pulmonares**

En la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), neumonía, sarcoidosis, el asma, las neumoconiosis, fibrosis pulmonar idiopática y tuberculosis se liberan citocinas inflamatorias, existe daño tisular, mutaciones genéticas, que favorecen la creación de un ambiente para el desarrollo y progresión de cáncer de pulmón (Miron et al., 2020).

#### **1.2.2.12. Infecciones**

Se ha planteado que distintos tipos de virus entre los que se encuentran el virus del papiloma humano (VPH), VIH, COVID-19 aumentan el riesgo de desarrollo de cáncer de pulmón tras un daño agudo (Chaitanya et al., 2021).



**Figura 5.** Etiología del cáncer de pulmón.

### 1.2.3. Sintomatología y diagnóstico

El cáncer de pulmón es heterogéneo y puede originarse en diversos puntos del árbol bronquial, por lo que los síntomas y signos son variables. Si un paciente presenta dolor torácico, tos constante, tos acompañada por sangre (hemoptisis), dificultad para respirar, cansancio, sibilaciones, disminución de peso, infección pulmonar frecuente se debe considerar la posibilidad de presentar cáncer de pulmón. Al inicio pueden ser síntomas inespecíficos, lo que dificulta una identificación temprana y compromete su diagnóstico (National Cancer Institute, 2024).

El estudio sugerido para diagnosticar cáncer de pulmón es la tomografía computarizada (TC) con dosis bajas de radiación, ya que presenta una sensibilidad mayor que la radiografía de tórax. Pero también se enumeran a continuación otras técnicas complementarias (OMS, 2023; National Cancer Institute, 2024):

- Exploración física.
- Estudio citológico de esputo (para observación de moco expulsado al toser y evaluar la presencia de células tumorales).
- Radiografía de tórax: procedimiento no invasivo, utilizado para la obtención de una imagen tridimensional y determinar así la localización específica de esta neoplasia.
- Toracocentesis (procedimiento para la extracción y el análisis del líquido pleural).
- Imágenes por resonancia magnética (IRM).
- Tomografía por emisión de positrones.
- Pruebas moleculares.
- Biopsia: es una prueba confirmatoria de NSCLC y para determinar el subtipo histológico.

El diagnóstico patológico indica el grado, el tipo y localización del tumor para otorgar una terapia adecuada (National Cancer Institute, 2024).

#### **1.2.4. Tratamiento**

La terapéutica del cáncer de pulmón depende del estadio tumoral, características clínicas y moleculares de cada paciente. Entre las estrategias terapéuticas más comunes se encuentran (OMS, 2023; ESMO, 2019):

- Cirugía.

Método más adecuado en etapas tempranas para la resección del tumor con márgenes amplios. Después de este procedimiento se recomienda un estudio de TC de rutina por los primeros años consecutivos (OMS, 2023).

- Radioterapia.

Útil para etapas iniciales del cáncer de pulmón cuando el paciente no puede ser sometido a una cirugía (ESMO, 2019).

- Quimioterapia.

Su uso es flexible, puede ser administrada en fase pre y postquirúrgica de NSCLC como un tratamiento adicional ante la posibilidad de la presencia de células cancerígenas. También se recomienda el uso de tratamientos paliativos para disminuir los síntomas de estos fármacos (ESMO, 2019).

- Tratamiento dirigido y anti-angiogénico

Son compuestos que tienen como objetivo la reducción de la proliferación celular en NSCLC en estadios avanzados mediante el bloqueo particular de vías de señalización, siendo los siguientes: (ESMO, 2019)

- a. Inhibidores de KRAS G12C.
- b. Inhibidores de mTOR
- c. Anticuerpos monoclonales.
- d. Inhibidores de tirosina-cinasa.
- e. Bloqueadores de canales iónicos

- Inmunoterapia.

La inmunoterapia es utilizada para activar o restaurar células inmunitarias para potenciar el reconocimiento y destrucción de células neoplásicas (NCI, 2025).

Actualmente se continúa con una búsqueda persistente de tratamientos más eficaces y seguros, lo que ha impulsado la identificación de blancos moleculares relacionados con la viabilidad y proliferación de las células tumorales, entre los que destacan, están los canales iónicos (NCI, 2025).

### **1.3. Canales iónicos**

La membrana celular es una estructura dinámica que delimita la parte interior de la célula y está conformada por una bicapa lipídica que controla el transporte de sustancias (moléculas, nutrientes, iones) a través de diversos mecanismos (Anaya et al., 2023).

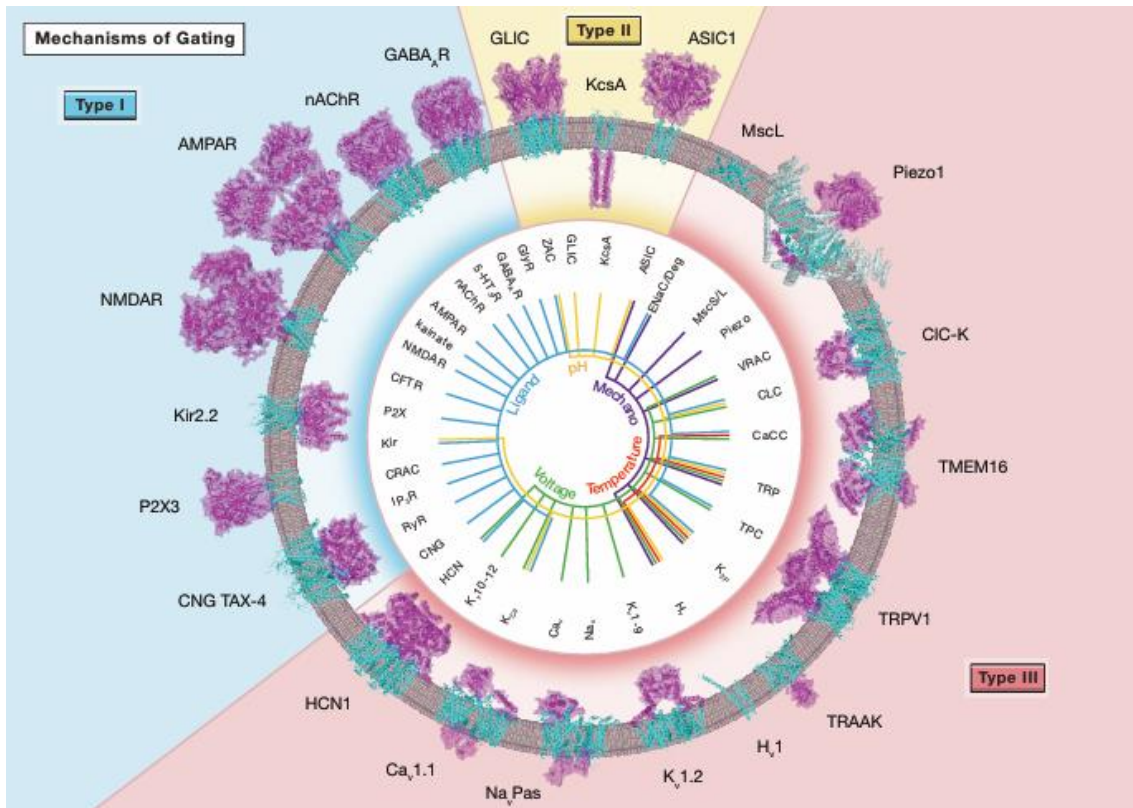
Los canales iónicos son proteínas transmembranales que forman poros que permiten el desplazamiento selectivo de iones (con tamaño y carga eléctrica específica) de acuerdo con su gradiente electroquímico (Anaya et al., 2023).

Los experimentos pioneros de registro electrofisiológico fueron realizados por Hodgking y Huxley, quienes, al fijar el potencial de membrana del axón gigante de calamar, evidenciaron la existencia de poros selectivos a iones (Hodgkin & Huxley, 1952).

El desarrollo en el conocimiento de los canales iónicos continuó con la implementación de la técnica de fijación en parche de membrana, creada por Bert Sakmann y Erwin Neher, utilizando un microelectrodo de vidrio que registra las corrientes iónicas que pasan a través de los canales en la membrana celular (Neher et al., 1978).

Los canales iónicos son esenciales para regular el volumen celular, proliferación, migración celular, apoptosis, transducción de señales, generación y propagación de potencial de acción, mantenimiento de potencial de membrana, reconocimiento celular para el mantenimiento de la homeostasis en diversos tejidos (Roux et al., 2017). Alteraciones en su expresión o función pueden perturbar los mecanismos antes mencionados, promoviendo potencialmente una transformación neoplásica, caracterizada por una proliferación exacerbada y adquisición de un comportamiento tumoral agresivo (Prevarskaya et al., 2018).

Los canales iónicos se agrupan en dependientes de ligando, regulados por segundos mensajeros, canales iónicos mecano sensibles y canales iónicos dependientes de voltaje (Qiwen et al. 2023). Ver figura 6.



**Figura 6.** Clasificación de los canales iónicos. Tipo I (Fondo color azul) canales activados por ligando. Tipo II (Fondo amarillo) sensibles a pH). Tipo III (Fondo rojo) canales sensibles a estímulos físicos como estímulo mecánico, temperatura o voltaje. (Tomado y modificado de Goldschen et al., 2017).

### 1.3.1. Canales de potasio

La clasificación de los canales de potasio depende de la secuencia de aminoácidos que contiene la subunidad del poro. Existen 3 familias (Nerbonne, 2016):

- Canales rectificadores de entrada (Kir): formado por 2 segmentos transmembranales y un poro. Conduce mayor cantidad de iones de potasio al interior de la célula.
- Con dos dominios de poro (K2P): son canales de potasio de fuga formados por 4 segmentos transmembranales y 2 poros que permanecen abiertos en el potencial de membrana en reposo.

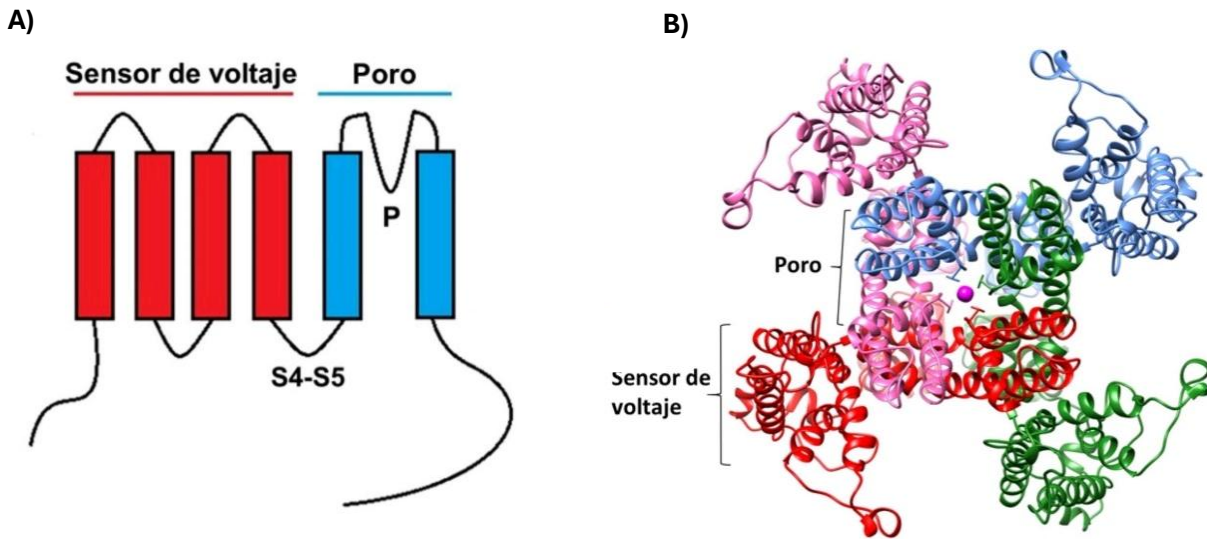
- Canales dependientes de voltaje (VGKC) con 6 segmentos transmembranales y 1 poro. Se describen a detalle a continuación, ya que es parte del tema central del proyecto.

### **1.3.2. Canales de potasio dependientes de voltaje (VGKC)**

Se han reportado aproximadamente 145 canales iónicos dependientes de voltaje (VGIC) donde 40 son canales de potasio dependientes de voltaje (VGKC), siendo la familia más variada estructural y funcionalmente (Luis et al., 2022).

Se dividen en 12 grupos por su semejanza genética y respecto a su función se subdividen en dos grupos: VGKC funcionales (familia Shaker, Shab, Shaw, Shal, KVLQT, KQT2, eag, erg, elk) y canales silenciosos dependientes de voltaje que generan canales funcionales si se heterodimerizan con KCNB como la familia de KCNF1, KCNG, KCNV, KCNS (Bachmann et al., 2020).

La secuencia peptídica de una subunidad  $\alpha$  atraviesa seis veces la membrana (S1-S6), los extremos amino y carboxilo de cada canal se encuentran hacia el interior de la célula (Figura 7). A pesar de que los canales VGKC coinciden en una estructura básica similar, se diferencian en sus bucles de conexión (enlazador), secuencia y largo de las terminales N y C (Delgado & Rodríguez, 2018).

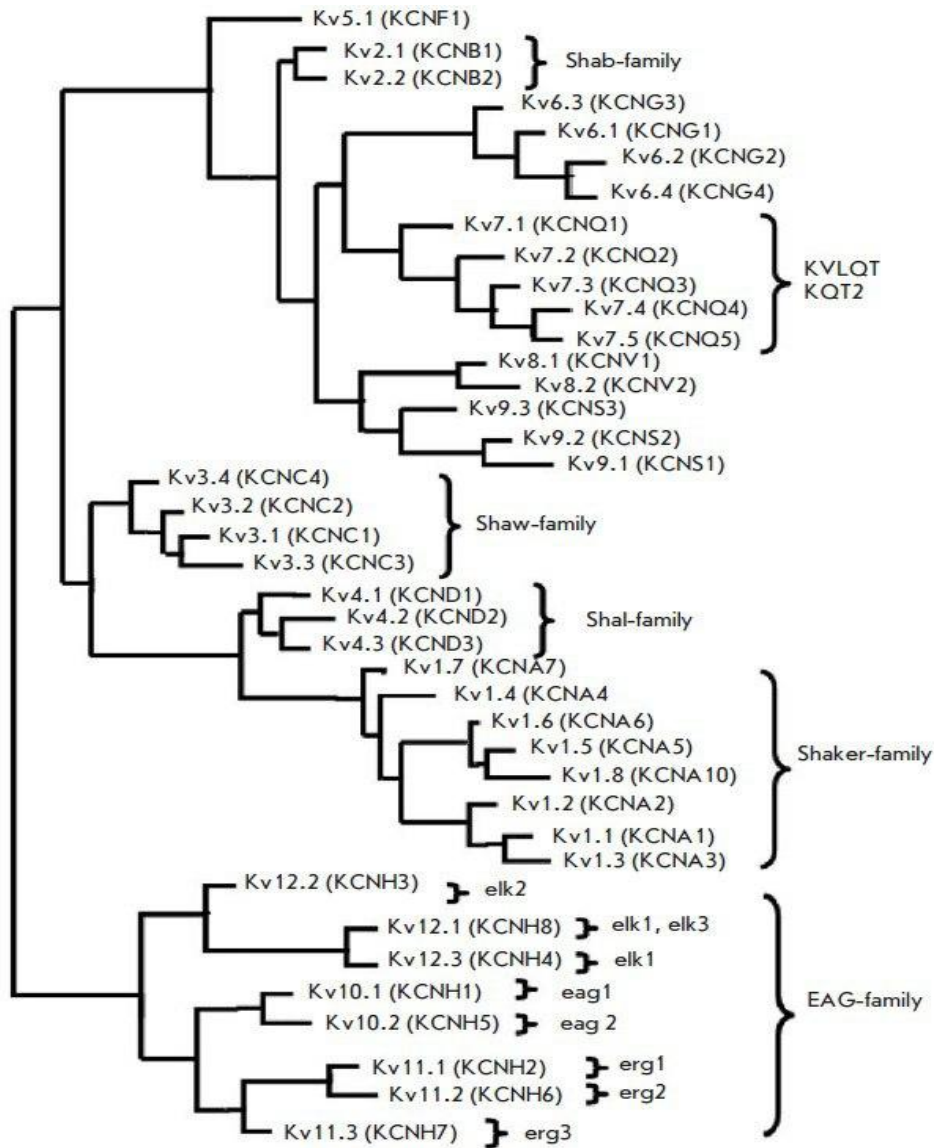


**Figura 7.** A) Estructura una subunidad alfa de canales VGKC y B) Imagen representativa del canal visto de la parte externa de la célula. (Tomado y modificado de Delgado & Rodríguez, 2018).

Los canales VGKC funcionales se ensamblan en el retículo sarcoplasmático a partir de cuatro subunidades, las cuales puede ser homotetraméricas o heterotetraméricas, como se ha observado en KCNA, KCNQ Y KCNH. Además, pueden unirse a subunidades auxiliares que se encargan de regular estos canales y determinar su ubicación en la membrana plasmática (Delgado & Rodríguez, 2018; Grizel et al., 2014).

Los cuatro primeros segmentos (S1- S4) forman el dominio de sensor de voltaje (VSD), S4 contiene aminoácidos positivos en cada tercera posición (arginina o lisina) extremadamente sensibles a cambios en el voltaje. El VSD se une a la región de poro mediante un asa S4-S5 (Ranjan et al., 2019).

Los últimos dos segmentos (S5-S6) y la región P forman parte del dominio del poro (PD) que permite la conducción selectiva de iones potasio y evita su paso cuando el canal se cierra (Xia, et al., 2023). Se ha reportado que una gran parte de los VGKC se abren cuando la membrana esta despolarizada y se cierran cuando la membrana esta hiperpolarizada (Kuang et al., 2015).



**Figura 8.** Representación esquemática de las familias VGKC respecto a su secuencia de aminoácidos, nombres de acuerdo con el Sistema de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) y nombres entre paréntesis otorgados por el Comité de Nomenclatura Genética de la organización del Genoma (Tomado y modificado de Grizel et al., 2014).

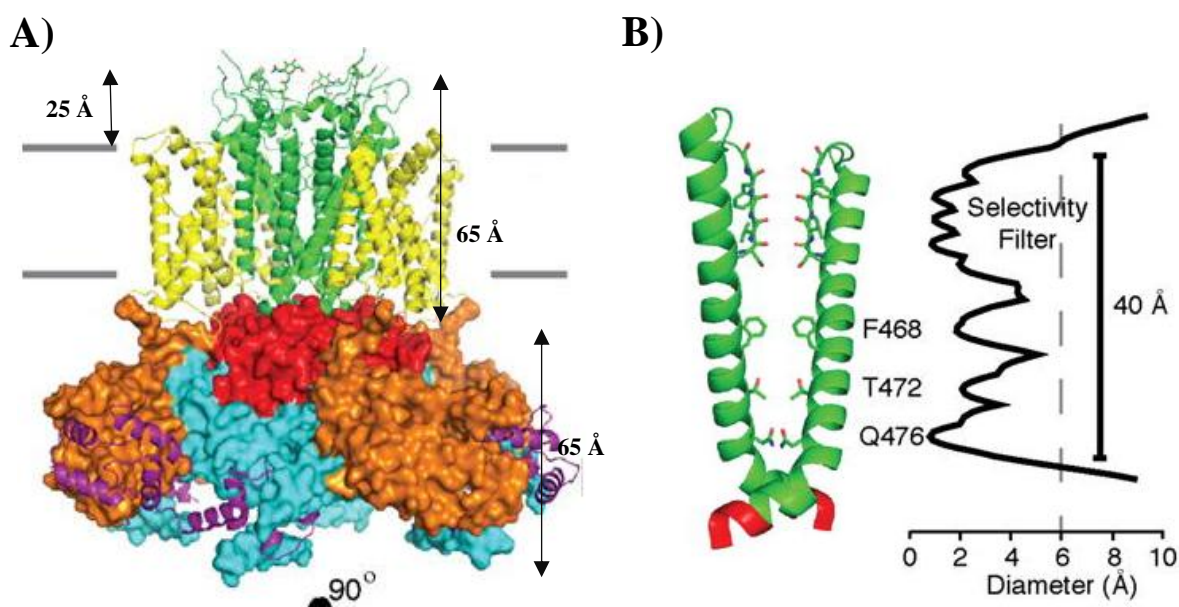
Una porción de la región P preservada (glicina-tirosina-glicina o glicina-fenilalanina-glicina) forma un filtro de selectividad que permite el reconocimiento exclusivo de ion potasio. Ver figura 7. (Ranjan et al., 2019).

Los canales VGKC se localizan en diversos tejidos y órganos, como músculo, corazón y cerebro. Su importancia radica en el control del umbral de disparo, del curso de un potencial de acción, rapidez de disparo, la señalización bioeléctrica rápida (Ranjan et al., 2019). Cuando

los genes que codifican VGKC tienen alguna alteración causan diversas enfermedades como epilepsia, ataxia, arritmias cardiacas, etc (Xia et al., 2023).

También los VGKC influyen en la creación de un microambiente exclusivo de células tumorales (Xia et al., 2023), contribuyen en la señalización para la división celular, participan en el ciclo celular y regulan el volumen de las células, la apoptosis, diferenciación (Grizel et al., 2014), exocitosis, el tráfico de proteínas y la dinámica del citoesqueleto (Delgado & Rodríguez, 2018).

La subfamilia EAG o KCNH (*ether-a-go-go*) modulan el flujo de K<sup>+</sup>. Su nombre se estableció por el gen que codifica esta familia. Este locus se reconoció inicialmente en la mosca *Drosophila melanogaster* cuando era modificado por éter generaba temblor en sus patas. En la región N-terminal, contiene una región Per-Arnt-Sim (PAS) influye en la velocidad de activación del canal (Lörinczi et al., 2016). Abarca 8 tipos de canales, clasificados en 3 conjuntos acorde a la semejanza de las secuencias, son *eag*, *erg* y *elk*.



**Figura 9.** A) Modelo del canal KCNH1. Dominio PAS (naranja), dominio PD (verde), VSD (amarillo), dominio CNBHD (acua), c-enlazador (rojo), membrana celular (líneas grises). B) Dominio del poro de canal KCNH1 (Tomado y modificado de Whicher & Mackinnon, 2016).

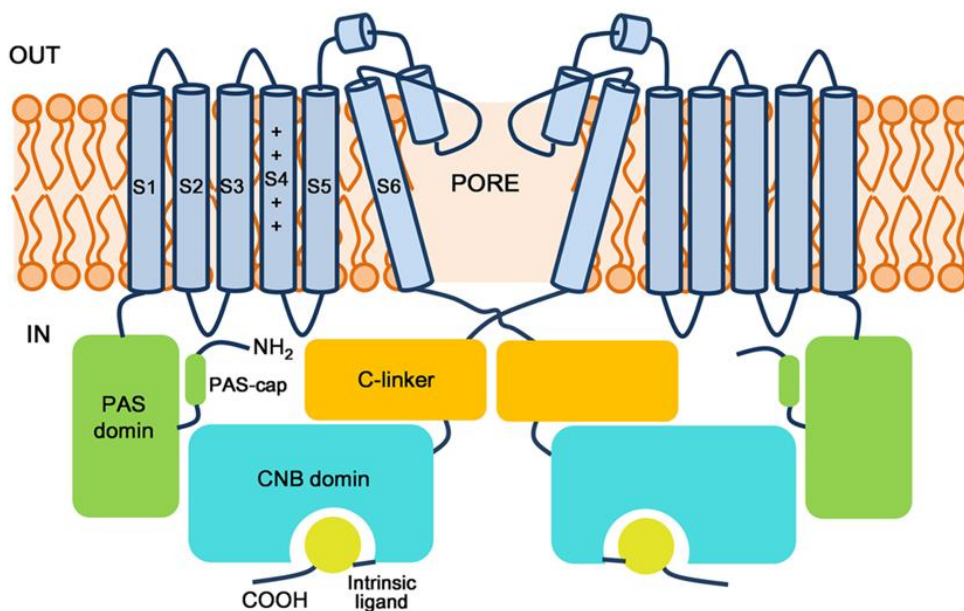
### 1.3.2.1. Canal de potasio dependiente de voltaje miembro 1 de la subfamilia H

Canal de potasio dependiente de voltaje miembro 1 de la subfamilia H (KCNH1) es un canal que está formado por cuatro subunidades que conforman el poro. Presenta propiedades únicas, tanto estructurales como funcionales que lo distinguen de otros canales de potasio activados por voltaje (Whicher & MacKinnon, 2016).

Tiene una hélice de 40 aminoácidos que abarca 25 Angstroms al exterior de la célula, rodea la parte de apertura del poro entre S5 y hélice del poro. Esta estructura no se encuentra en otros canales Kv, lo que le confiere una protección ante la presencia de toxinas. La conformación del poro no presenta una cavidad central definida subyacente al filtro de selectividad (Whicher & MacKinnon, 2016).

A diferencia de otros canales Kv (que tienen un enlazador de quince residuos), el canal KCNH1 tiene un conector S4-S5 (enlazador S4-S5) atípico que está formado por cinco residuos. Lo más sorprendente, es que aún sin la presencia del enlazador, el canal conserva su funcionalidad en la cinética de apertura y cierre de éste (Whicher & MacKinnon, 2016).

Se distingue por tener grandes extremos N y C, compuestos por dos dominios intracelulares responsables del 70 % aproximadamente de su masa molecular (Luis et al., 2022): un dominio N-terminal Per-Arnt-Sim (PAS) y en la región C-terminal contiene un



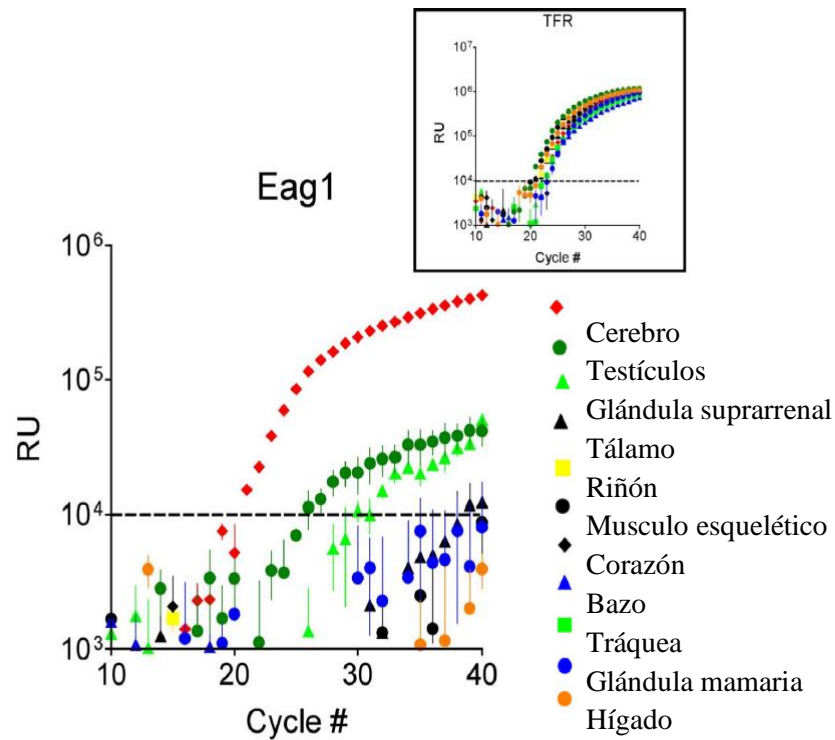
**Figura 10.** Esquema que incluye dos subunidades del canal KCNH1. Dominios transmembrana (azul), dominios PAS (verde) (Tomado y modificado de Wang et al., 2017).

dominio homólogo de unión a nucleótidos cíclicos (CNBHD). Ver Figura 10. (Whicher & MacKinnon., 2019; Whicher & MacKinnon, 2016).

Los dominios PAS presentes en proteínas que detectan estímulos ambientales, modulan la interacción proteína-proteína, interaccionan con el dominio CNBHD y el segmento S4 (Whicher & MacKinnon, 2019; Whicher & MacKinnon, 2016). Estudios sugieren que los dominios PAS y CNBHD funcionan como compuertas que dependen de voltaje, poseen un sensor de calcio calmodulina (CaM) y únicamente en presencia de calcio cada molécula de CaM se une a un sitio específico tanto en el dominio PAS como en CNBHD que mantiene el poro cerrado (Whicher & MacKinnon, 2019; Whicher & MacKinnon, 2016).

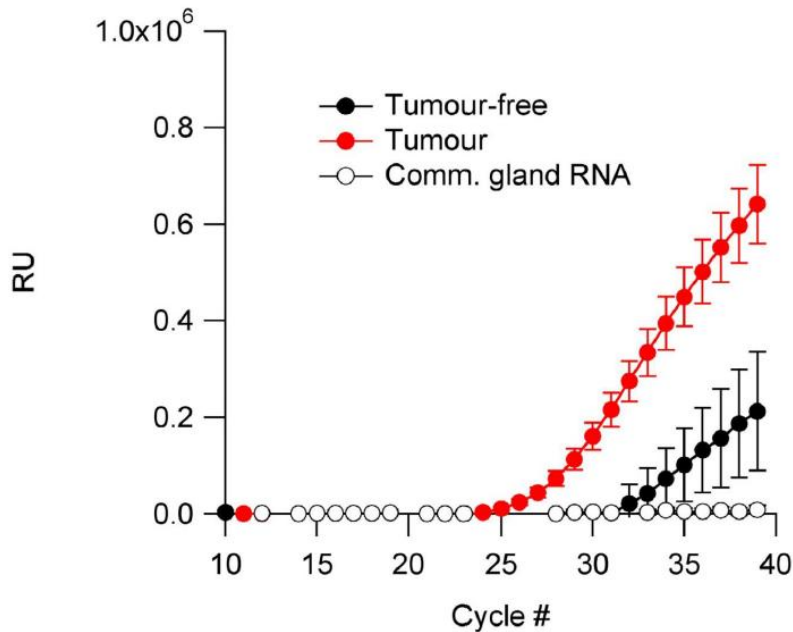
Estos canales están codificados por el gen KCNH1 de la subfamilia H del canal dependiente de voltaje de potasio. Esta secuencia de ADN se encuentra en el cromosoma 1, banda q32.2 y contiene 457,343 bases y 12 exones (Luis et al., 2022). Los canales KCNH1 se localizan en la membrana plasmática, pero también pueden encontrarse en membranas de orgánulos, como membrana nuclear interna, vesículas intracelulares y participa en el desensamblaje del cilio primario (Luis et al., 2022). Fisiológicamente, en condiciones normales no se identifican en tejidos periféricos, solo se expresan en regiones específicas del bulbo olfatorio, corteza cerebral, hipocampo, hipotálamo, cuerpo estriado y terminal presináptica de células de Purkinje (Luis et al., 2022).

Los resultados indican que el ARN de KCNH1 se expresa de manera preferencial en cerebro, testículos y glándula suprarrenal, los demás tejidos no mostraron una detección positiva. Figura 11. (Hemmerlein et al., 2006).



**Figura 11.** Detección del ARNm que codifica para KCNH1. (Tomado y modificado de Hemmerlein B. et al., 2006).

También, su sobreexpresión se ha reportado en varios tipos de cáncer como neuroblastomas, glioblastomas, metástasis cerebral, osteosarcomas, cáncer de mama, colon, gástrico, cuello uterino, pulmón, ovario, melanoma. Figura 12. (Hernández et al., 2020; Hemmerlein et al., 2006).



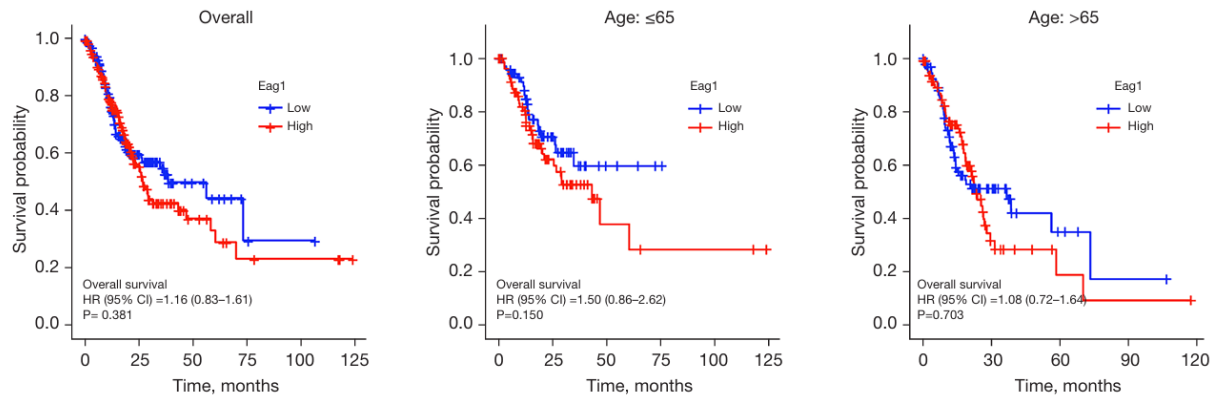
**Figura 12.** Detección del ARNm que codifica para *KCNH1* en muestras de tumores mamarios (Rojo  $N=11$ ), ARN pareados (círculos negros rellenos) y ARN de epitelio normal comercial (Círculos con contorno negro) (Tomado y modificado de Hemmerlein B. et al., 2006).

### 1.3.2.2. Canales de potasio dependiente de voltaje miembro 1 de la subfamilia H y cáncer

El estudio de los canales de potasio en tumores ha tenido un gran impacto debido a que forman el grupo más grande de canales a los que se les atribuye propiedades que causan proliferación o muerte celular programada, control del ciclo celular, migración y angiogénesis (Luis et al., 2022).

Se ha encontrado que los canales *KCNH1* se expresan en aproximadamente 70 % de los tipos de cáncer estudiados y líneas celulares (Luis et al., 2022) por lo que se les ha propuesto como un biomarcador tumoral (Oquadid et al., 2016). Pacientes con una alta expresión de *KCNH1* pueden tener un peor pronóstico en comparación con aquellos con niveles bajos. Ver figura 13. (Gao et al., 2022).

En múltiples tipos de cáncer, p53 está ausente o mutado, teniendo como consecuencia altos niveles de expresión del canal *KCNH1*, E2F1 y miR34a, que, en conjunto, regulan la actividad mitocondrial (Hernández et al., 2020).



**Figura 13.** Comparación de la supervivencia de pacientes con niveles de expresión altos y bajos de *KCNH1*, Análisis de Kaplan-Meier (Tomado y modificado de Gao et al., 2022).

Gao y colaboradores en el año 2022, mostraron el papel crucial que juega el canal *KCNH1* en la biología celular del cáncer gástrico, observando que la inhibición de estos canales afecta negativamente la función celular y la expresión de ciclina D1 y E1.

Estas evidencias, sugieren la participación de los canales de potasio *KCNH1* en la tumorigénesis, por lo que están siendo considerados como blancos farmacológicos. Hasta el momento, se han identificado un conjunto de moléculas que inhiben los canales *KCNH1*. Se ha reportado que cuatro moléculas se unen al VSD del canal, son: mibefradil, análogos naturales de bromotirosina purpurealidin I, 20(S)-ginósido Rg3 y amiodarona (Toplak et al., 2021).

## 2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

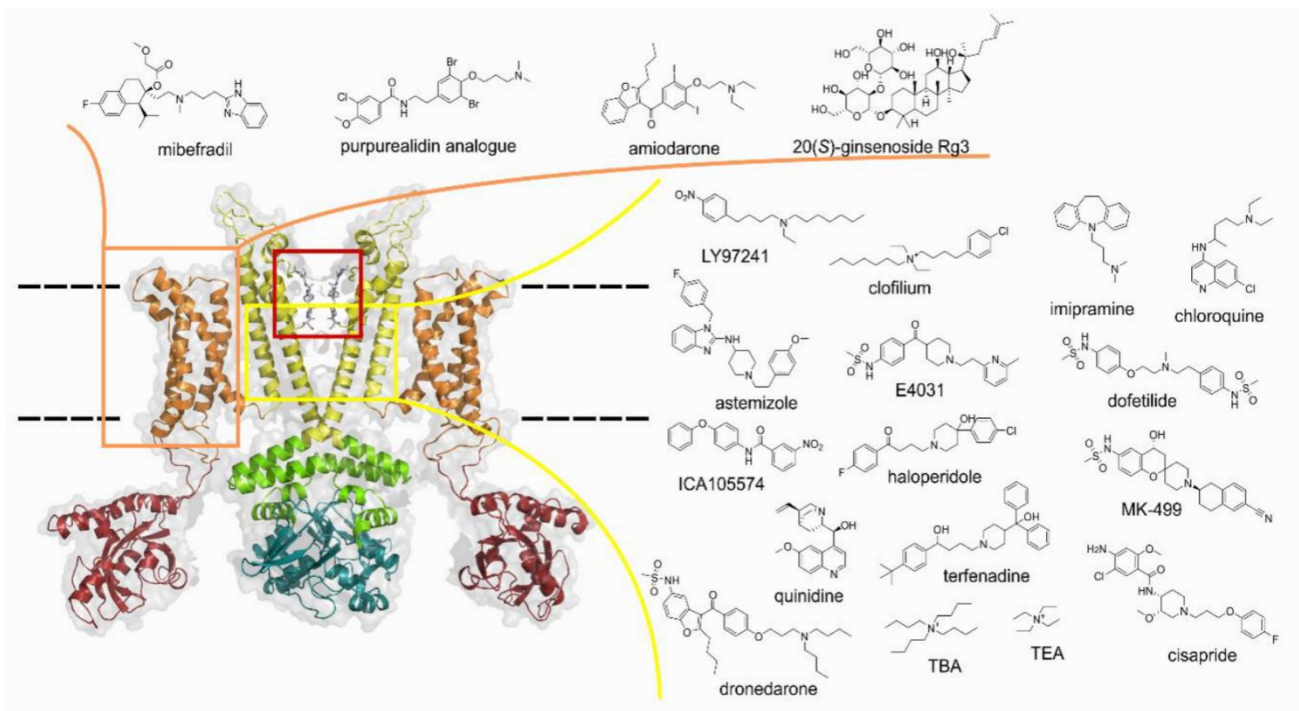
### 2.1. Amiodarona y desetilamiodarona

La amiodarona (AD) es un derivado de benzofurano yodado cuyo metabolito activo es la desetilamiodarona (DEA), producido por la desasetilación de su molécula madre por el citocromo P450 (CYP3A4), son compuestos con actividad antiarrítmica de la clase III de Vaughan Williams (Hamilton et al., 2020).

La AD fue sintetizada por primera vez por el Laboratorio Belga Labaz ante la necesidad de incluir nuevos fármacos antiarrítmicos con una respuesta terapéutica mayor y

superar las limitaciones de medicamentos como quinidina, lidocaína y mexantina. Posteriormente, fue utilizado particularmente en Sudamérica y Europa, después de amplias pruebas para controlar latidos irregulares del corazón (Balik et al., 2019). Y finalmente fue aprobada por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos de América (FDA) en su fórmula oral de 200 mg en 1985 y en su formulación intravenosa en 1995 (Florek, et al., 2023; Steinberg et al., 2020).

Actualmente se administra para la prevención y tratamiento de fibrilación ventricular frecuente y taquicardia ventricular inestable (National Center for Biotechnology Information, 2024). También se ha reportado que cuenta con características antioxidantes y antiinflamatorias (Chang et al., 2018). El blanco farmacológico de este compuesto es el bloqueo de los canales de potasio principalmente los canales de potasio dependientes de voltaje (VGKC) pero también en menor cantidad canales de sodio, el intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) y los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L (Almendral et al, 2014; Hamilton et al., 2020; Ketchem, et al., 2018; Kim et al., 2011; Li et al., 2016; Steinberg et al., 2020). Ver figura 14.



**Figura 14.** Estructura de dos subunidades de *KCNH1* con el dominio de sensor de voltaje (VSD) (naranja), región de poro y cavidad central (amarillo) y filtro de selectividad (rojo). Tomado y modificado de Toplak et al. (2021).

La AD se prescribe con mayor frecuencia por su gran efectividad, aunque es necesaria una supervisión minuciosa del paciente debido a sus efectos adversos, la mayoría de estos efectos son reversibles con una reducción de la dosis o interrupción temporal (National Center for Biotechnology Information, 2024). Las concentraciones plasmáticas terapéuticas de AD van de 1 a 2.5 µg/ml, cifras superiores a estas, son consideradas tóxicas (Goldschlager et al., 2007; Siddoway et al., 2003).

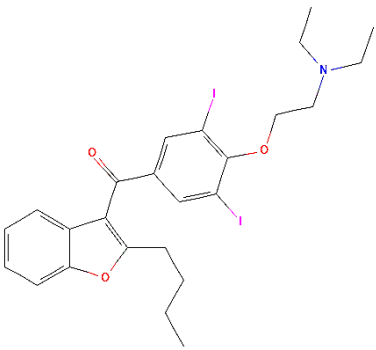
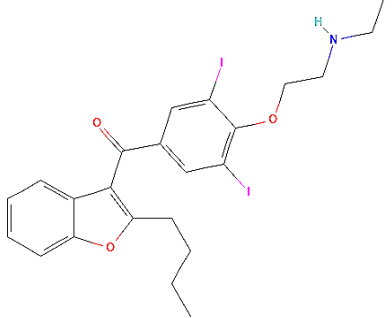
Además, la AD tiene una biodisponibilidad diferente tras la administración oral (una variación del 22 al 95 %). El comienzo de su acción es dependiente de la vía de administración, ocurre después de unas horas si la administración es intravenosa, en cambio, después de una administración oral tarda 2 o 3 días, aunque a menudo puede tardar de 1 a 3 semanas.

Posteriormente, la AD es metabolizada en el hígado y en menor medida en la pared del intestino por medio de una reacción de desetilación oxidativa favorecida principalmente por el citocromo p450 3A (CYP3A) (metabolizando el 40 % del fármaco las primeras 24 h de administración), pero también se ha reportado la participación, aunque en menor medida, de otras isoformas de la enzima CYP como CYP1A1, 2C8 Y 2D6 convirtiéndola a desetilamiodarona y didesetilamiodarona (National Center for Biotechnology Information, 2024).

La principal vía de excreción de este compuesto es por vía biliar y fecal, con eliminación menor por vía renal y vía lagrimal (Goldschlager, et al., 2007).

Desetilamiodarona (2-butil-1-benzofurano-3-yl)-[4-[2-(etilamino) etoxi]-3,5-diidodofenil ]metanona se caracteriza por una falta de un grupo etilo, tiene una estructura más pequeña (National Center for Biotechnology Information, 2024).

**Tabla 1.** Características fisicoquímicas de Amiodarona y desetilamiodarona. (Datos tomados de National Center for Biotechnology Information, 2024).

Criterio	Amiodarona	Desetilamiodarona
Fórmula		
Peso molecular (g/mol)	645.3	617.3

### **2.1.1. Amiodarona y cáncer**

Estudios proponen a AD como un candidato potencial que revierte la resistencia a múltiples fármacos, sensibiliza a las células tumorales en respuesta a la quimioterapia, posee propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, puede reducir la citotoxicidad y mejorar el efecto en una amplia variedad de tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama, ovario y glioma, carcinoma de próstata, carcinoma hepatocelular al utilizarlo en conjunto o individualmente. Si bien, el mecanismo de acción de este compuesto no ha sido elucidado completamente, se ha propuesto que este fármaco pudiese actuar a través de múltiples vías (Steinberg et al., 2020; Chang et al., 2018).

La glicoproteína P (PGP) codificada por el gen MDR-1, una proteína dependiente de ATP localizada en la membrana expulsa diversos fármacos provocando resistencia a las antraciclinas. Varios ensayos han reportado que AD es un importante agente que revierte la resistencia a múltiples fármacos, actuando mediante la fosforilación de PGP (Chauffert et al., 1986).

Se ha identificado que AD exhibe una doble acción: efectos citoprotectores al reducir el daño al ADN de células sanas, a la vez induce apoptosis en células HeLa al estimular los niveles de SRF3 truncado y disminuir los niveles de miR-224 (promotor de la proliferación y supervivencia) que se encuentra regulado al alza en NSCLC, y el carcinoma hepatocelular. Esta disminución es acompañada de un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y un decremento de TNFAIP1, p21, caspasa 3 y miR224, elementos relacionados con eventos proapoptóticos (Chang et al., 2018).

También se ha observado un aumento en la tasa apoptótica de la línea celular representativa de leucemia mieloide aguda (U937) sugiriendo que la AD podría tener un papel importante en la muerte celular programada. El mecanismo propuesto se centra en la inhibición de la vía de señalización mediada por AKT, donde hay una reducción de los niveles de p-AKT, evitando así, la proliferación, crecimiento y supervivencia celular. La AD es una molécula lipofílica que puede atravesar membranas celulares y posiblemente introducirse a la

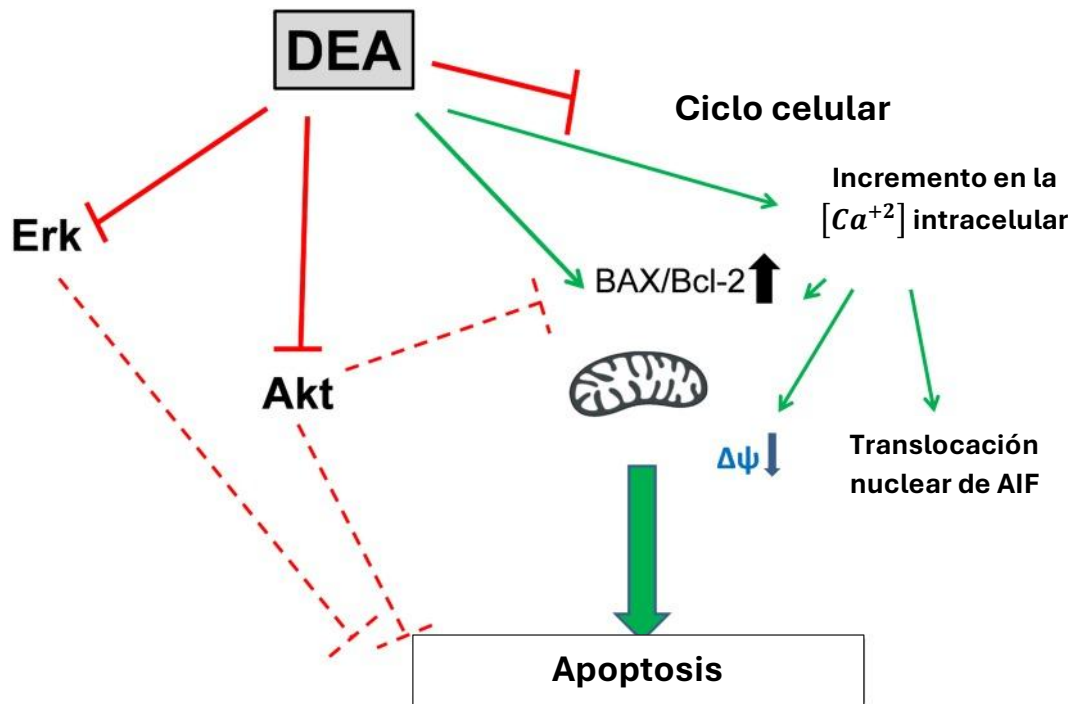
mitocondria e inhibir el canal Kv 1.3, provocando la liberación de especies reactivas de oxígeno y finalmente apoptosis (Ketchem et al., 2018).

### **2.1.2. Desetilamiodarona y cáncer**

Desetilamiodarona (DEA), es el principal metabolito activo de la amiodarona (AD) que se produce en una reacción de N-desmetilación catalizada por el citocromo P450 (Bognar et al., 2017a), su estructura es más pequeña y menos hidrofóbica que AD y de acuerdo con Gómez-Lagunas et al., (2024), DEA puede inhibir canales KCNH1 en estado cerrado y abierto, sin embargo, su efecto es mayor cuando el canal está abierto (Lagunas et al., 2024).

En un trabajo se observó que la presencia de DEA reduce significativamente la población celular de la línea celular T24, alterando el potencial de membrana mitocondrial, favoreciendo el arresto de las células en la fase G0/G1 de su ciclo, fragmentación de núcleos, reducción de Bcl-2 (factor anti-apoptótico), incremento de Bax (factor pro-apoptótico), activación de la caspasa 3 (ejecutora de la apoptosis), aumento en la escisión de PARP-1, reducción de la actividad de la vía ERK y AKT, que estos procesos en conjunto, favorecen la muerte de las células T24. Ver Figura 15. (Bognar et al., 2017a).

Si bien existen múltiples evidencias que sugieren la relación del uso de AD y DEA en el cáncer, su efecto sobre células provenientes de cáncer de pulmón no ha sido totalmente descrito.



**Figura 15.** Posible mecanismo de acción de DEA. Descripción gráfica de diferentes vías de señalización reportadas por las que DEA produce apoptosis en células cancerígenas. (Tomado y modificado de Bognar et al., 2017).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El cáncer de pulmón de células no pequeñas es un problema de gran importancia en el ámbito de la salud pública, pues ocupa la tercera causa de muerte por cáncer en México y se caracteriza por desarrollar a mediano y largo plazo, resistencia a la quimioterapia y radioterapia. Frente a este panorama, surge la necesidad de identificar blancos farmacológicos que ayuden de manera efectiva al tratamiento de dicha enfermedad.

Estudios recientes muestran que las células tumorales sobre-expresan canales de potasio tipo KCNH1, los cuales regulan entre otras funciones, la proliferación celular, control de la apoptosis, angiogénesis, supervivencia celular y migración, por lo que estos canales podrían ser considerados como potenciales blancos moleculares para una terapia dirigida eficaz.

Por lo anterior, en el presente trabajo se propone evaluar el efecto de bloqueadores específicos de los canales de potasio KCNH1, tales como la amiodarona (AD) y desetilamiodarona (DEA), sobre la capacidad proliferativa, migratoria y apoptótica de células no pequeñas de cáncer de pulmón. Y de manera complementaria, investigar si la presencia de AD y DEA altera la viabilidad mitocondrial.

#### **4. HIPÓTESIS**

Amiodarona (AD) y desetilamiodarona (DEA) reducen la capacidad proliferativa y migratoria de la línea tumoral A549, proveniente de cáncer de pulmón de células no pequeñas.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1. Objetivo general**

Determinar el efecto que ejercen amiodarona y desetilamiodarona sobre la capacidad proliferativa y migratoria en la línea celular A549.

##### **5.2. Objetivos específicos**

**5.2.1.** Evaluar el efecto sobre la capacidad proliferativa de las células A549 en presencia de amiodarona y desetilamiodarona.

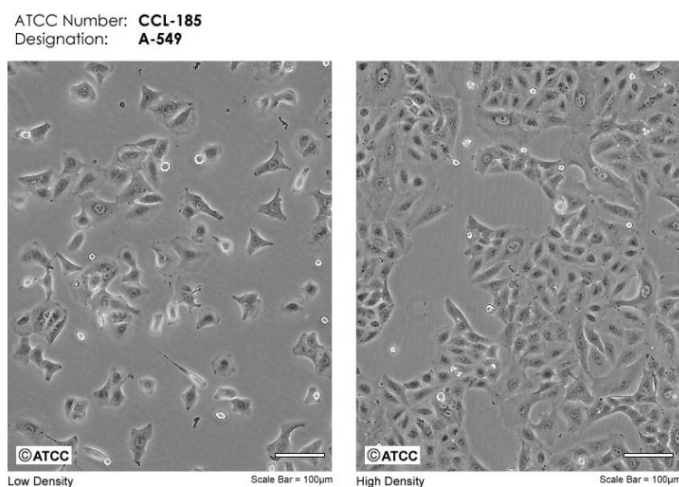
**5.2.2.** Determinar el efecto que ejercen amiodarona y desetilamiodarona sobre la capacidad migratoria en la línea celular A549.

**5.2.3.** Averiguar si la presencia de amiodarona y desetilamiodarona alteran la viabilidad mitocondrial en las células A549.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. Cultivo celular de la línea tumoral A549

Las células A549 son una línea celular inmortalizada derivada de un adenocarcinoma pulmonar humano de células epiteliales basales alveolares, aisladas de un paciente masculino de 58 años en 1972, y se utilizaron como modelo experimental.



*Figura 17. Morfología celular de la línea tumoral A549. Las micrografías muestran la morfología mesenquimal de las células A549, a) baja confluencia y b) alta confluencia.*

#### 6.1.1 Características de cultivo y mantenimiento de la línea celular A549

Las células crecen en modalidad de monocapa y fueron sembradas en matraces de cultivo de poliestireno de 25 cm<sup>2</sup> de superficie, con medio de cultivo Advanced-DMEM suplementado con 4% de suero fetal bovino (SFB), 1% de L-glutamina y 1% de una mezcla de antibiótico-antimicótico (10,000 unidades/mL de penicilina, 10,000 µg/mL de estreptomycin y 25 µg/mL de anfotericina B). Se mantuvieron en una incubadora a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se renovó cada 24 horas y cada 7 días se sometieron las células a un proceso de tripsinización, a partir del cual se tomaron alícuotas para regenerar el cultivo madre y sembrar las células para los experimentos propuestos.

### **6.1.2. Tratamiento con amiodarona y desetilamiodarona**

El tratamiento que se utilizó para este proyecto tuvo una duración de 48 horas con amiodarona 10  $\mu$ M y desetilamiodarona 2  $\mu$ M.

### **6.2. Ensayo de proliferación celular**

Para evaluar la capacidad proliferativa de las células A549, fueron sembradas en placas de 6 pozos, una vez alcanzado un 50 % de confluencia, se inició con el tratamiento con AD y DEA. Al cumplir con el tiempo estipulado, se retiró el medio, se lavaron con PBS y se tripsinizaron; la suspensión celular resultante fue transferida a tubos tipo eppendorf y de ahí se tomó una alícuota para combinar volumen a volumen con azul de tripano, como colorante vital, para el conteo celular.

### **6.3. Ensayo de migración**

Las células A549 fueron cultivadas en 3 cajas Petri y se mantuvieron hasta que alcanzaron el 70% de confluencia, posteriormente se inició del tratamiento de 48 h (control, AD, DEA). Al concluir, se realizaron dos lavados con 2 mL de PBS estéril, se adicionaron 500  $\mu$ L de tripsina estéril por 5 minutos y finalmente 750  $\mu$ L de medio Advance-DMEM libre de suero fetal bovino. Al recuperar la suspensión celular, se tomó una alícuota de 1,000  $\mu$ L para realizar el conteo celular y se procedió a realizar los cálculos para sembrar 30,000 células por condición.

Se utilizaron soportes permeables Transwell con membranas de policarbonato con poros de 8  $\mu$ m de diámetro. Para mantener la condición experimental, en la parte inferior se colocaron 750  $\mu$ L del tratamiento con AD y DEA disuelto en el medio Advance-DMEM suplementado con 4% de suero fetal bovino (SFB) y en la parte superior de la membrana de policarbonato se sembraron 30,000 células hasta llegar a un volumen final de 300  $\mu$ L en cada condición.

Las células se incubaron a 37 °C en 95 % de aire y 5% de CO<sub>2</sub> durante 18 h. Al finalizar el tiempo las células que permanecieron sobre la membrana interna del inserto fueron retiradas. Las células que migraron permanecieron en la parte inferior de la membrana de policarbonato del inserto y fueron fijadas con una mezcla de metanol/acetona 1:1 por 20 minutos a 4 °C, seguido de una tinción con el colorante cristal violeta por 10 minutos y por último para la eliminación del exceso de colorante las células se lavaron varias veces con agua tridestilada. Se mantuvieron en refrigeración hasta su visualización en un microscopio de campo claro Leica DM1000 utilizando un objetivo 10X, cámara Jenoplik Jena ProgRes10 plus y el programa ProgRes CapturePro 2.1 y para el conteo celular se utilizó Image J generado por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América. Se realizó la cuantificación de 3 campos aleatorios por condición y los datos fueron normalizados respecto al control.

#### **6.4. Ensayo de viabilidad mitocondrial**

Se empleó el kit comercial MitoTracker (MT) de la marca Thermo Scientific, con el fin de evaluar la viabilidad de las mitocondrias mediante un marcaje con sonda fluorescente, es decir, un compuesto químico lipofílico que atraviesa la membrana plasmática de mitocondrias y facilita su visualización por medio de microscopia confocal sin necesidad de procedimientos adicionales, donde la intensidad de fluorescencia representa la viabilidad mitocondrial. Se siguieron las siguientes instrucciones del fabricante para realizar el ensayo.

##### **6.4.1. Preparación de la solución madre de Mitotracker Red CMXRos**

Se realizó una mezcla de 50 µg del reactivo más 94 µL de dimetil sulfóxido (DMSO), obteniendo una solución de 1 mM.

##### **6.4.2. Preparación de solución de trabajo a 200 nM**

Se tomó 0.2 µL de la solución madre de MT a 1mM con 999.8 µL de PBS 1X para una solución con un volumen total de 1000 µL.

### **6.4.3. Preparación de la muestra**

Las células A549 fueron cultivadas sobre cubreobjetos circular en 1 placa de 6 pozos, y se mantuvieron hasta que alcanzaron aproximadamente el 70% de confluencia, posteriormente se inició del tratamiento de 48 h (control, AD, DEA). Al concluir, se retiró el medio de cultivo, para fijarlas se adicionaron 2000  $\mu$ L de metanol/acetona 1:1 por 20 minutos a 4 °C. Se realizaron dos lavados con 2 ml de PBS por 5 minutos, un lavado con 2 ml Triton 1X por 15 minutos y finalmente un lavado con 2 ml PBS por 5 minutos. Se incubaron en una cámara oscura con 1,500  $\mu$ L de la solución de Mitotracker 200 nM por pozo durante 30 minutos, posteriormente se realizaron dos lavados con 2 mL de PBS por pozo por 5 minutos. Finalmente se procedió a montar cada cubreobjetos circular en un portaobjetos, se adicionaron 50  $\mu$ M de medio de montaje con DAPI, se cubre con un cubreobjetos de 22 x 22 mm, se sellaron con barniz y una vez secos se observaron en el microscopio confocal Nikon C2 plus, con parámetros constantes. a) Se tomaron 3 campos aleatorios por condición y se determinó la intensidad de fluorescencia promedio del Mitotracker en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF). b) Para evitar las variaciones en el número de células entre condiciones, se normalizó UAF respecto al número de células. El recuento de células se realizó mediante el conteo de núcleos marcados con DAPI en los mismos campos antes mencionados. La medida relativa de fluorescencia (UAF/CEL) representa la viabilidad mitocondrial por célula.

## **6.5. Ensayo de expresión génica (RT-PCR de punto final)**

Se evaluaron los niveles de expresión de ARNm que codifican para diversos factores asociados a la capacidad proliferativa, supervivencia y muerte celular: Ki-67, Ciclina E, Ciclina B, Bax, Bcl-2, BIRC3.

### **6.5.1. Extracción de ARN total**

Las células fueron sembradas en placas de 6 pozos, al alcanzar la confluencia esperada (más del 60%) se realizó un cambio de medio y se adicionó el tratamiento correspondiente. Al cumplir con el tiempo estipulado se procedió a realizar la extracción de ARN total con el kit FavorPrep™ total RNA purification, siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 6.5.2. Cuantificación de ARN

La cuantificación fue realizada por espectrofotometría, donde se valoró la concentración y calidad de ARN extraído.

### 6.5.3. Transcripción reversa

La transcripción reversa (RT) es una técnica para obtener una hebra de ADN complementaria (ADN<sub>c</sub>) a partir de ARN mensajero (ARN<sub>m</sub>) mediante la participación de la enzima transcriptasa reversa. Se empleó el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription, se siguieron las instrucciones del fabricante para la mezcla de diferentes componentes como se muestra en la tabla 1, se colocó un volumen de 6  $\mu$ L del mix a todas las muestras:

*Tabla 2. Componentes del kit RT*

Componente	Cantidad por muestra ( $\mu$ L)
Buffer RT	4
dNTP's	1
Random	0.5
MuL	0.5
Total	6

El volumen final por utilizar fue de 20  $\mu$ L, por lo que el volumen restante se complementó con agua libre de nucleasas y muestra. La cantidad de ARN procedente de las células A549 para cada tubo fue de 4  $\mu$ g. Se empleó el termociclador Mastercycler S50, con

la siguiente serie de pasos: 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37° C, 5 minutos a 85°C. Al finalizar, los tubos se resguardarán a 4 °C hasta su uso.

#### 6.5.4. Reacción en cadena de la polimerasa

Por medio del ADN complementario se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el kit comercial DreamTaq PCR Master Mix, según las indicaciones del proveedor, se obtuvo un volumen total de 20 µL. Se colocaron los diferentes componentes del kit y 2 µL de cada muestra, como se observa en la tabla 2.

*Tabla 3. Componentes del kit para PCR*

Componente	Cantidad por muestra (µL)
Dream taq green	10
Primer fw	1
Primer rv	1
Agua libre de nucleasas	6
Muestra	2
Total	20

A la mezcla se le adicionaron los siguientes oligonucleótidos sentido y anti-sentido (diseñados con el programa proporcionado en internet por la empresa idt-DNA y sigma-aldrich). para la amplificación específica.

*Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados*

Oligonucleótido		Secuencia	Temperatura de alineamiento (°C)	Tamaño esperado (pb)
<b>Control</b>				
β actina	Cebador directo	CAAGAGATGGCCACGGCTGCT	72.9	275
	Cebador inverso	TCCTTCTGCATCCTGTCGGCA		
<b>Marcador asociado con la proliferación celular</b>				
Ki-67	Cebador directo	AGTACCAGGAGGTGAGGATAAA	62.6	415
	Cebador inverso	CTGCACTGGAGTTCCCATAAA		
<b>Marcadores asociados con el ciclo celular</b>				
Ciclina B1	Cebador directo	TTGGTGTCACTGCCATGTTT	63.7	314
	Cebador inverso	TAAGCAAAAAGCTCCTGCTG		
Ciclina E1	Cebador directo	CGTTCTCTTCTGTCTGTTGCA	64.3	317
	Cebador inverso	TACAACGGAGCCCAGAACA		

<b>Marcadores anti-apoptóticos</b>				
BIRC3	Cebador directo	CACTCATTACTTCCGGGTACAG	60.7	420
	Cebador inverso	AACACTAGAGGGCCAGTTAAAG		
BIRC5	Cebador directo	GGACAGAGAAAGAGCCAAGAA	62.35	590
	Cebador inverso	GGCACAGGTGTGACAGATAA		
Bcl-2	Cebador directo	GCTTTCACCTCCAGGATCTATT	63.1	551
	Cebador inverso	CCCAATACAGGTCCTTCATACC		
<b>Marcador proapoptótico</b>				
Bax	Cebador directo	GGGCTGGACATTGGACTTCC	68.2	201
	Cebador inverso	AGATGGTGAGTGAGGCGGTG		
<b>Canal de potasio dependiente de voltaje KCNH1</b>				
KCNH1	Cebador directo	AGGATTGAGTGAGCGAGTAATG	62.0	421
	Cebador inverso	ATGCAGATCACAGTAGGTCAAG		

### **6.5.5. Electroforesis para la separación de productos de la reacción en cadena de la polimerasa**

Posteriormente se procedió a separar los productos obtenidos (amplicones) de PCR mediante electroforesis horizontal, utilizando geles de agarosa al 1.2 % y bromuro de etidio para su tinción (BrEt). Se colocaron 5  $\mu$ L de marcador de peso molecular y 9  $\mu$ L de muestra y se realizó la separación de los productos en una preparación de Tris acetato EDTA (TAE) 1X a 65 voltios, 400 mA por 90 minutos.

Las imágenes se obtuvieron mediante un documentador de geles (Gel Documentation System – Bc oxigen). Posteriormente la densitometría de las bandas se realizó mediante el programa *Image J* proporcionado gratuitamente por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América.

### **6.6 Análisis estadístico**

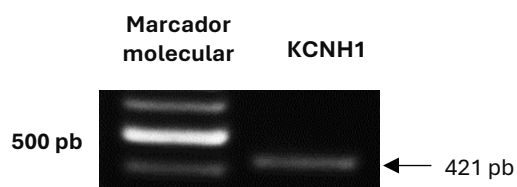
Se utilizó el programa SigmaPlot 12.5 (Jandel Corporation, EUA) para el análisis estadístico y generación de gráficas. Se empleó la prueba t de Student, para muestras independientes con varianzas homogéneas y distribución normal, para estimar la diferencia entre las medias de los datos obtenidos para cada grupo experimental; y se determinó si entre dichos parámetros hay diferencias estadísticamente significativas o no, tomando como parámetro de significancia, un valor de  $p < 0.5$  (\*). Las gráficas muestran el valor promedio  $\pm$  error estándar. Cada ensayo se realizó por triplicado de manera independiente.

## **7. RESULTADOS**

### **7.1. Expresión del ARNm que codifica para el canal de potasio dependiente de voltaje miembro 1 de la subfamilia H en células A549.**

Como primer paso, se decidió investigar si las células A549 expresan el ARNm que codifica para el canal de potasio KCNH1, por lo que se realizaron ensayos de RT-PCR de punto final.

La Figura 17 ilustra la presencia del ARNm que codifica para el canal de potasio KCNH1, validando nuestro modelo experimental.

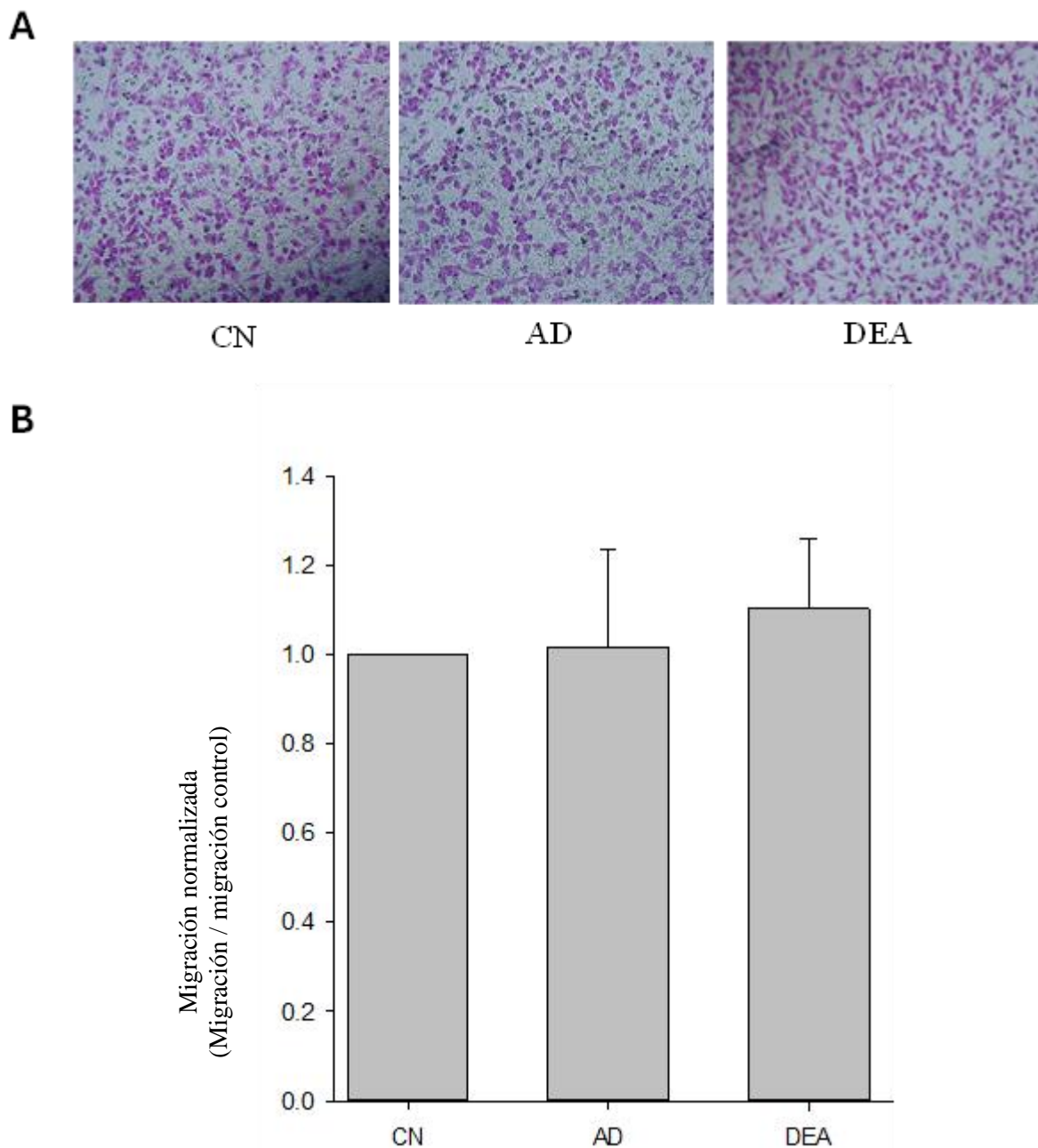


**Figura 17. Presencia del ARNm que codifica para el canal de potasio KCNH1 en células A549 mantenidas en condiciones de cultivo estándar.** Se realizó la extracción del ARNm de las células A549, posteriormente la realización de RT-PCR. Se logró amplificar la secuencia específica para KCNH1. En el primer carril, se encuentra el marcador de peso, en el carril 2 el ARNm que codifica para KCNH1 con una extensión de 421 pb.

## **7.2. Amiodarona y desetilamiodarona no modifican la capacidad migratoria de las células A549.**

Las células tumorales se caracterizan por su alta capacidad migratoria, lo cual asegura su éxito en la diseminación a otros tejidos y órganos, proceso conocido como metástasis. Para evaluar esta característica, se decidió explorar, si el bloqueo de los canales de potasio KCNH1 afectaba la capacidad migratoria de las células A549.

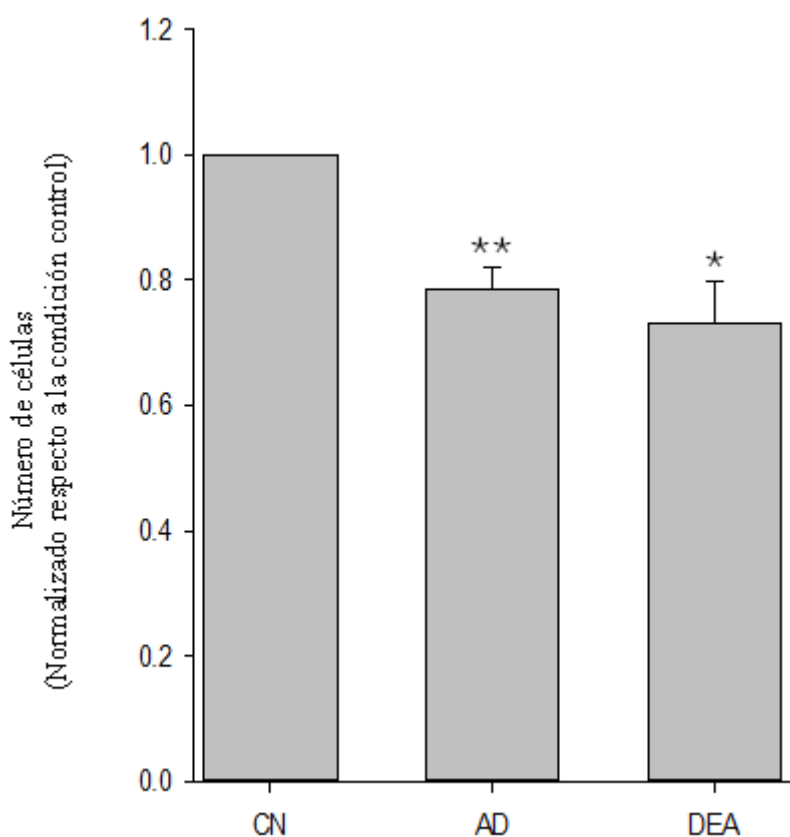
Las células A549, se mantuvieron por 48 horas en presencia de 10  $\mu$ M de AD o 2  $\mu$ M de DEA, al finalizar el tratamiento, las células fueron cosechadas y se sembraron 30,000 células en cada inserto de la cámara transwell, con el fin de evaluar su capacidad migratoria. La presencia de AD y DEA no afecta de manera significativa el porcentaje de células A549 que migran a través de los poros del inserto de la cámara transwell, con respecto a la condición control (Figura 18).



**Figura 18. Migración de las células A549 tratadas con AD y DEA.** A) Imágenes representativas de los ensayos de migración en la condición control, tratadas con AD y DEA. Las imágenes fueron tomadas con un objetivo 10X. B) Análisis semicuantitativo de la migración celular en las cámaras transwell. No se observan cambios significativos en la migración,  $n=3$ . \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$  y  $p \leq 0.001$

### 7.3. Ambos compuestos reducen la viabilidad de las células A549.

Estudios previos, mostraron que la presencia de AD y DEA ejerce un efecto negativo en la viabilidad de diferentes líneas tumorales. Basado en estos antecedentes, se decidió evaluar si la presencia de los compuestos es capaz de ejercer efectos citotóxicos sobre la línea celular A549, para lo cual, las células fueron mantenidas en presencia de 10  $\mu\text{M}$  de AD y 2  $\mu\text{M}$  de DEA por 48 horas. Al finalizar el tratamiento, se cuantificaron las células en una cámara de Neubauer, empleando el colorante vital azul de tripano, y solamente se contabilizaron las células vivas. La Figura 19 muestra que el tratamiento con AD y DEA reduce de manera significativa la población celular A549, aproximadamente en un 20 % y un 25% respectivamente, en comparación con la condición control.

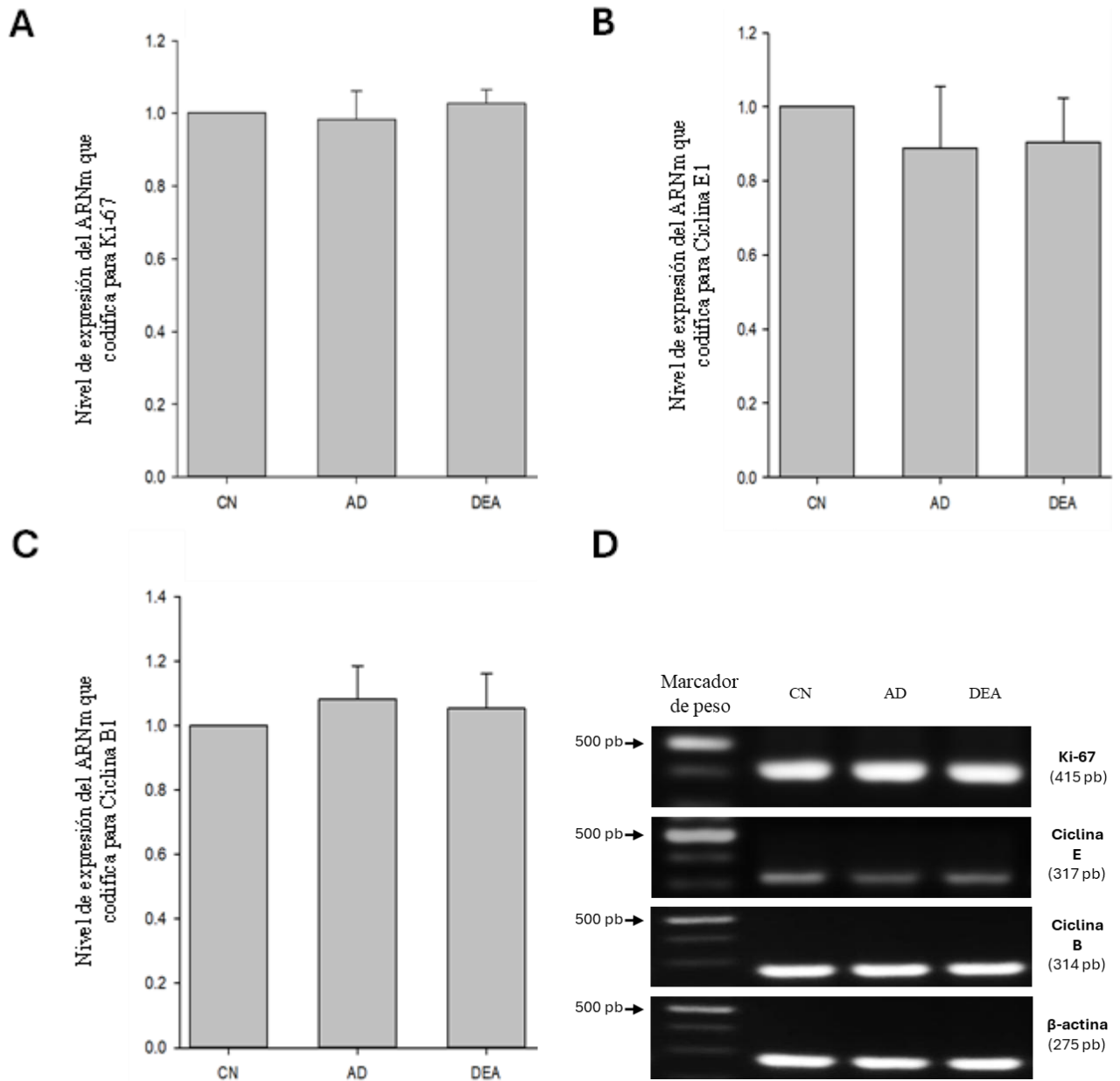


**Figura 19. Proliferación celular en células A549 tratadas con AD y DEA.** Para evaluar la capacidad proliferativa, los cultivos de células A549 fueron tratados con AD 10  $\mu\text{M}$  y DEA 2 $\mu\text{M}$  durante 48h, posteriormente se realizó un conteo celular con ayuda de una cámara de Neubauer. El tratamiento con AD, redujo aproximadamente 20% ( $p=0.004$ ) el número de células con respecto a la condición control, mientras que la DEA, en un 25% ( $p=0.015$ ),  $n=3$ . \*  $p\leq 0.05$ , \*\*  $p\leq 0.01$

#### **7.4. Amiodarona y desetilamiodarona no inciden sobre la capacidad proliferativa de las células A549.**

El número de células que conforman una población celular depende del balance de dos procesos fisiológicos antagónicos, por un lado, de su capacidad proliferativa, relacionada con la duración de su ciclo celular, y, por otro lado, de su capacidad apoptótica. En estos términos, el decremento observado en la población celular A549 debido a la presencia de AD y DEA (Figura 19), puede deberse a una reducción en su capacidad proliferativa o a un incremento en su capacidad apoptótica. Con el fin de evaluar la primera posibilidad, se evaluó el nivel de expresión del ARNm que codifica para marcadores moleculares asociados a la capacidad proliferativa: Ki-67, ciclina B y ciclina E. La proteína Ki-67, es un marcador nuclear de proliferación celular, mientras que la ciclina E, es una proteína que favorece el tránsito de la célula de la Fase G1 a la fase S, donde ocurre la duplicación del material genético. Por su parte, la ciclina B, es una proteína que participa en la decisión “todo o nada” para la entrada de la célula a la etapa de división celular, es decir, favorece el paso de la fase G2 a la fase M del ciclo celular.

La presencia de ambos compuestos no modifica de manera significativa los niveles de expresión del ARNm que codifican para los diferentes marcadores moleculares relacionados con la proliferación celular: Ki-67, Ciclina E y ciclina B (Figura 20).



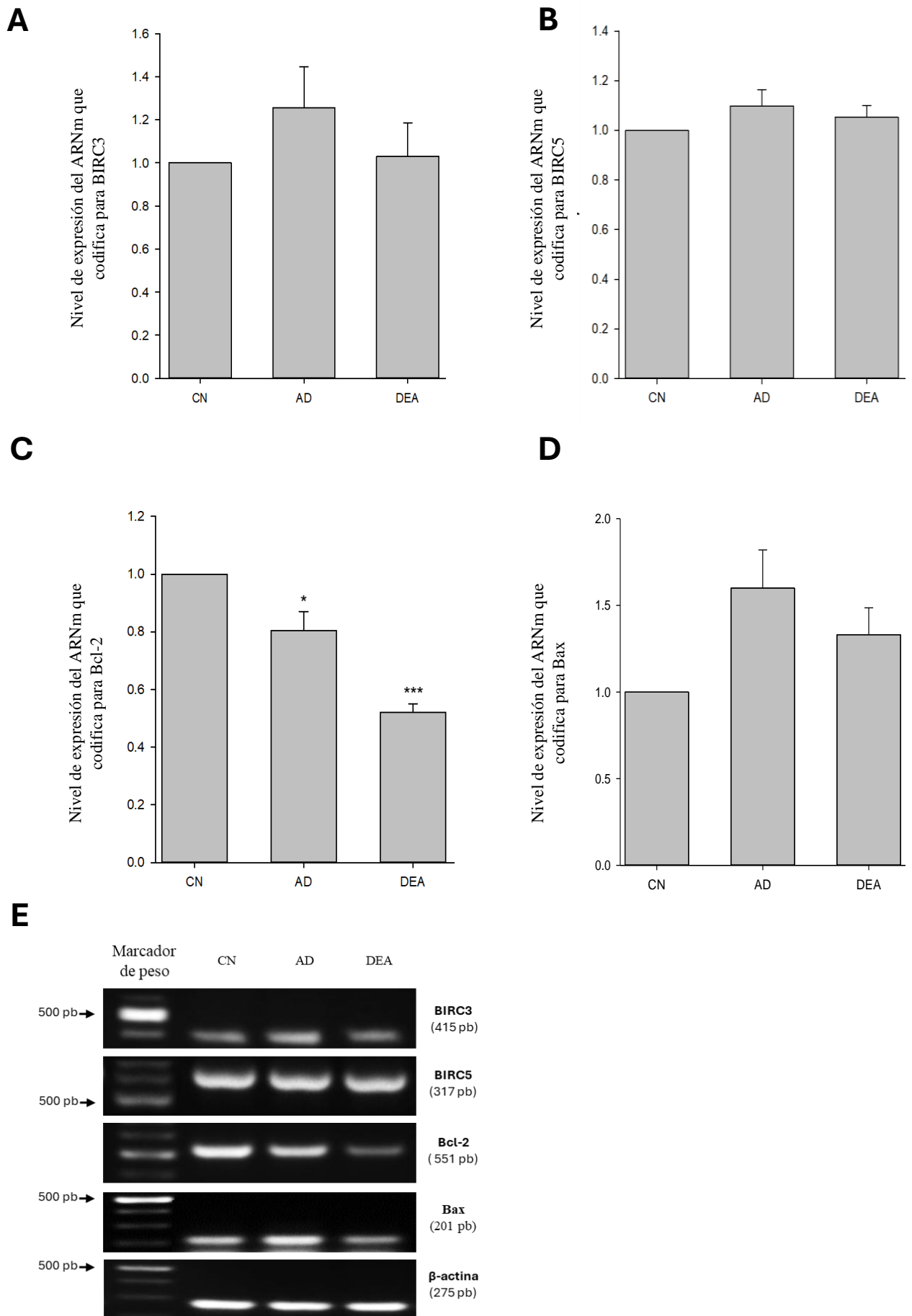
**Figura 20. Niveles de expresión de Ki-61, ciclina E1 y ciclina B1.** Mediante RT-PCR se evaluó la amplificación de los fragmentos de ADNc que codifica para A) Ki67, B) Ciclina E1, C) Ciclina B1 en células A549 tratadas con AD Y DEA. D) Imágenes representativas de los geles usados para evaluar los niveles de expresión de marcadores asociados a la capacidad proliferativa.  $n=3$ . \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$  y  $p \leq 0.001$ . Normalizado respecto a  $\beta$ -actina.

### 7.5. Amiodarona y desetilamiodarona exacerbaban la capacidad apoptótica de las células A549.

Los resultados presentados hasta el momento muestran que la reducción de la población celular inducida por la presencia de AD y DEA, no se debe a cambios en la capacidad proliferativa de las células A549, por lo que, se decidió evaluar la segunda posibilidad, que estos compuestos estuviera acelerando la capacidad apoptótica de las células A549.

La apoptosis es una forma de muerte celular programada, que regula la densidad celular en tejidos y órganos, tanto en la etapa embrionaria como en la etapa posnatal de los seres vivos pluricelulares. Particularmente, las células tumorales se caracterizan por presentar una baja tasa apoptótica, asegurando con ello, el crecimiento y progresión de los tumores. La tasa apoptótica de las células es regulada por el balance que se da entre los niveles de expresión de factores anti-apoptóticos y factores pro-apoptóticos. Diversos compuestos con efecto anti-tumoral, exacerban la capacidad apoptótica de las células cancerígenas, ya sea reduciendo la expresión de factores anti-apoptóticos o favoreciendo la expresión de factores pro-apoptóticos.

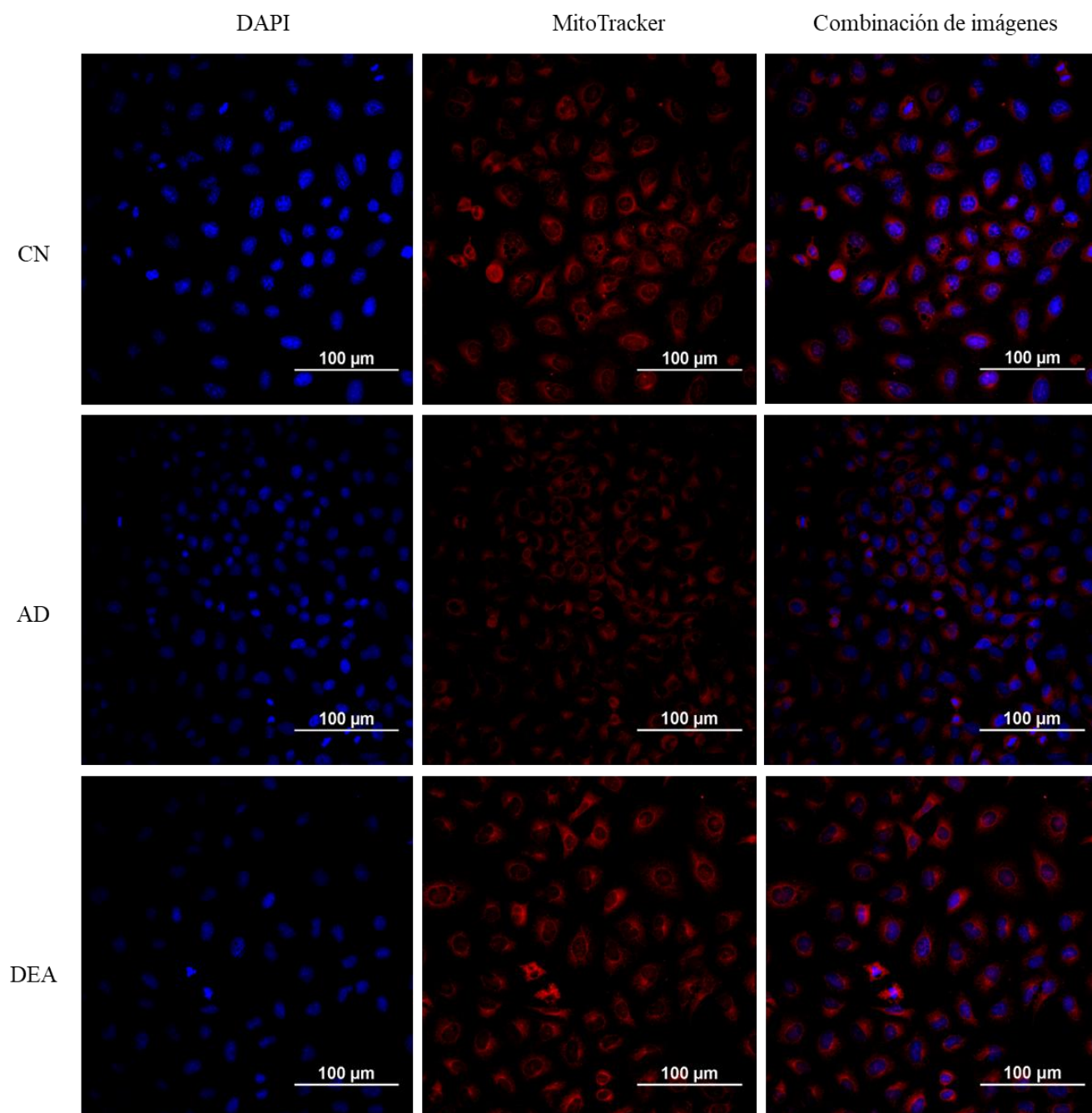
Se procedió a investigar, si el efecto inhibitorio sobre la densidad celular que ejercen la AD y su metabolito sobre las células A549, se debe a un incremento en su capacidad apoptótica, para lo cual se evaluó el nivel de expresión del ARNm que codifican para factores anti-apoptóticos (BIRC-3, BIRC-5 y Bcl-2) y factores pro-apoptóticos (Bax). Al igual que en los experimentos anteriores, las células A549 fueron tratadas en presencia de 10  $\mu$ M de AD y 2  $\mu$ M de DEA por 48 horas. La Figura 21 muestra que la presencia de estos compuestos induce una reducción significativa del 20 % ( $p = 0.041$ ) y 45 % ( $p < 0.001$ ) respectivamente, en la expresión del ARNm que codifica para la proteína anti-apoptótica Bcl-2, y una clara tendencia al alza, en la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax, mientras que los niveles de expresión de BIRC-3 y BIRC-5, no resultan alterados, todo esto, con respecto a la condición control.



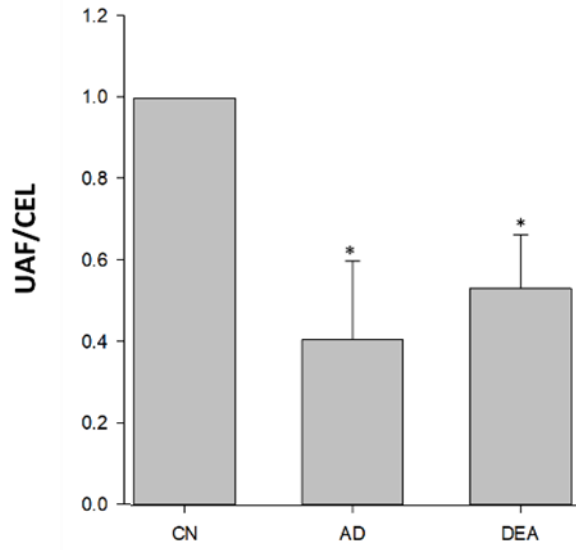
**Figura 21. AD y DEA incrementan la capacidad apoptótica de las células A549.** Las células A549 fueron tratadas con AD 10  $\mu$ M y DEA 2  $\mu$ M por 48 horas. Al finalizar el tratamiento, se realizó el ensayo de expresión génica, mediante la técnica de RT-PCR de punto final para evaluar la amplificación de los fragmentos de ADNc que codifica para factores anti y pro-apoptóticos: **A)** BIRC-3; **B)** BIRC-5; **C)** Bcl2 y **D)** Bax.  $n=3$ . \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$  y  $p \leq 0.001$ . Los niveles de expresión fueron normalizados respecto a  $\beta$ -actina.

### **7.6. Estos compuestos favorecen la apoptosis a través de la alteración de la función mitocondrial de las células A549 (apoptosis intrínseca).**

La apoptosis puede ser inducida mediante dos vías, la vía extrínseca y la vía intrínseca. Particularmente en la vía intrínseca, resulta alterada la viabilidad mitocondrial, reduciéndose la producción de ATP y la activación del apoptosoma. Se consideró evaluar si la apoptosis inducida por AD y DEA, recurre a la vía intrínseca, por lo que se determinó la viabilidad mitocondrial empleando el kit MitoTracker Red CMXRos. El tratamiento con los dos compuestos inducen una reducción significativa en la viabilidad mitocondrial, expresada en unidades relativas de fluorescencia (AUF/CEL). Ver figura 22 y 23.



**Figura 22. AD y DEA reducen la viabilidad mitocondrial.** Imágenes de microscopía confocal a 40x representativas de cada condición AD (10  $\mu$ M) y DEA (2  $\mu$ M). Tinción con Mitotracker (rojo) y DAPI (azul), de manera individual y conjunta.



**Figura 23. AD y DEA reducen la integridad mitocondrial.** Las células A549 fueron mantenidas por 48 horas en presencia de AD y DEA, para posteriormente realizar la medición fluorométrica empleando el kit MitoTracker Red CMXRos.  $n=3$ . \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$  y  $p \leq 0.001$

## 8. DISCUSIÓN

Los canales KCNH1 fueron los primeros canales dependientes de voltaje en asociarse con el proceso de desarrollo de células cancerosas (Toplak et al., 2021). Uno de los primeros indicios directos de que los canales KCNH1 son importantes para la carcinogénesis se registra en 1999, debido a una sobreexpresión de los canales de potasio KCNH1 en las células CHO, promoviendo características típicas de transformación maligna. Este estudio sugiere que estos canales tienen un papel fundamental en la proliferación y alteraciones en su expresión pueden producir una proliferación patológica, que se define como un incremento anormal de la tasa de división celular que da como resultado un crecimiento tumoral, es decir formación de una masa anormal de tejido (Pardo LA, et al., 1999). Se ha reportado la presencia de KCNH1 en diversos tipos de cáncer, como neuroblastoma, fibrosarcoma, glioblastoma, osteosarcoma, melanoma, leucemia linfocítica aguda, así como también en diversos órganos como, mama, colon, estómago, cuello uterino, ovario y pulmón (Hernández et al., 2020; Hemmerlein et al., 2006, Toplak et al., 2021). Con esta información, decidimos confirmar la presencia de KCNH1 a nivel de ARNm en células A549, provenientes de cáncer de pulmón de células no pequeñas. Observamos mediante ensayos de RT-PCR que las células A549 expresan KCNH1, este resultado se alinea con los datos de la literatura, como los reportados por Luis et al., (2022) donde reportó altos niveles de expresión de KCNH1 en muestras tumorales y líneas celulares a comparación de muestras normales. Lo que valida el uso de esta línea celular como un modelo para el estudio de KCNH1.

La actividad de los canales de potasio KCNH1 está relacionada con dos propiedades celulares, la proliferación y la migración de células tumorales (Luis et al., 2022). Por ejemplo, se ha revelado que al inhibir la expresión de KCNH1 mediante la transfección de un siARN aumentó la quimiosensibilidad y potenció el efecto citotóxico del cisplatino en las células de cáncer de ovario (Hui et al., 2015). De igual forma se han utilizado aislados proteicos provenientes del veneno de tarántulas, anemonas, escorpiones que son selectivos al tejido tumoral, reducen el nivel de expresión de Ki-67, se ha reportado que reduce la proliferación, migración e invasión celular en el cáncer de mama, endometrio, páncreas, aumenta el nivel de expresión de factores proapoptóticos pero algunas desventajas son algunos compuestos provienen de especies peligrosas y su efecto es menor a comparación de otras sustancias

químicas dirigidos a estos canales (Dueñas et al., 2020; Moreels et al., 2017). Asimismo, se ha observado que el silenciamiento de estos canales en el osteosarcoma disminuye la expresión de diversas proteínas esenciales en la vía STAT3-VEGF responsables de la proliferación y metástasis celular (Wu et al., 2015). También diversas investigaciones resaltan la relación entre la expresión de KCNH1 y la supervivencia de los pacientes, por ejemplo, una expresión elevada se asocia con el grado de malignidad, así como con una menor probabilidad de supervivencia en pacientes con cáncer gástrico (Gao et al., 2022), cáncer de mama (Li et al., 2017), glioblastoma multiforme y metástasis cerebral (Martínez et al., 2015) por lo que surge la necesidad imperiosa de la búsqueda de nuevas moléculas inhibitoras de estos canales.

Actualmente en el campo de la oncología, el reposicionamiento de fármacos ha tomado relevancia, es la búsqueda de nuevos usos de compuestos seguros y aprobados por la FDA para otras enfermedades. Entre los beneficios a su favor se resalta la seguridad y conocimiento profundo de estos compuestos, reducción de los costos y el tiempo del desarrollo de un nuevo fármaco. En este sentido, se ha propuesto el uso de agentes antiarrítmicos como AD para el tratamiento contra el cáncer (Belur et al., 2018).

Respecto a la capacidad migratoria de las células A549, posterior al tratamiento con AD y DEA no observamos un efecto significativo comparado con la condición control. Los investigadores liderados por Weng (2018) no observaron modificaciones en el nivel de  $\alpha$ -SMA en células A549, tanto a nivel de proteína como del ARNm. En estudios previos se menciona que al utilizar 12.5  $\mu$ M de DEA se observa una reducción en la migración por muerte celular de aproximadamente del 50% de las células mientras que para DEA 7.5  $\mu$ M se observa un efecto inhibitorio menor de la migración de la línea celular MDA-MB-231 (Ramadan, et al., 2024). Por otra parte, en células U-87 se observó una reducción significativa del 81% aproximadamente en el número de células que migraron (Steinberg et al., 2020). En tal sentido, bajo lo referido anteriormente, ante la diversidad de posibles efectos y bajo nuestras condiciones experimentales, observamos que la presencia de AD y DEA no afectaba la capacidad migratoria de las células A549, resultado similar al de Weng y colaboradores.

En esta investigación al evaluar la capacidad proliferativa de las células A549 en presencia de AD 10  $\mu$ M y DEA 2  $\mu$ M, tras 3 ensayos independientes y el análisis de resultados, se pudo encontrar que ambos tratamientos reducen significativamente la población celular del

20 % y aproximadamente del 25 % respectivamente respecto al grupo control. Estos hallazgos están en línea con investigaciones anteriores, como las de Ramadan (2024) en células MDA-MB-231 se observó un efecto mayor en la reducción de la viabilidad al utilizar DEA a dosis más bajas a comparación de AD. Similarmente, Steinbeinber et al. (2020) mostró una reducción significativa de la tasa de proliferación de células U-87 con 10  $\mu$ M de AD del 18%. También se ha reportado este mismo efecto en líneas celulares (U937 y MV411) pertenecientes a leucemia mieloide aguda, con una reducción de más del 50 % de la población al utilizar 10  $\mu$ M de AD (Ketchem, C. et al., 2018). Resulta relevante que la AD (de 5 a 10  $\mu$  no muestra una alteración significativa en la integridad de astrocitos normales, presentando un efecto selectivo sobre células tumorales (Kim et al., 2011). Por otra parte, en líneas celulares de melanoma (B16-F19) y cáncer de cuello uterino (HeLa), se observó una disminución casi del 40% y 15 % respectivamente en la viabilidad celular al ser tratadas con 2.5  $\mu$ M de DEA. Además, en células T24 se reportó una reducción significativa a 48 h (Bognar et al., 2017a, 2017b, 2020, 2018). Estos resultados son interesantes al evidenciar que la disminución en la población celular es dependiente de la línea celular con la que se trabaja y que el uso de DEA a dosis más bajas a comparación de AD podría minimizar los efectos secundarios.

Con el fin de reforzar estas evidencias, decidimos evaluar el nivel de expresión del ARNm que codifica para Ki-67, un marcador nuclear de la proliferación celular, en la práctica clínica su expresión elevada se relaciona con mal pronóstico (Li et al., 2015). En nuestro trabajo no se observaron cambios significativos, esto puede explicarse por la presencia de subpoblaciones con una mayor capacidad de proliferación y supervivencia en la línea celular A549 como lo sugiere Gao et al (2019).

Referente a observar si AD y DEA alteran el ciclo celular de las células A549, no observamos cambios en los marcadores moleculares para ciclina B1 y E1. En células Hela se realizó un análisis del ciclo celular tras un tratamiento por 6 horas con AD, donde aumentó significativamente el porcentaje de células en la fase G1 y Sub-G1 y una disminución en la fase S y G2/M. Además, de observarse una reducción del ARNm que codifica para ciclina D1 dependiente de la dosis (Chang et at., 2018).

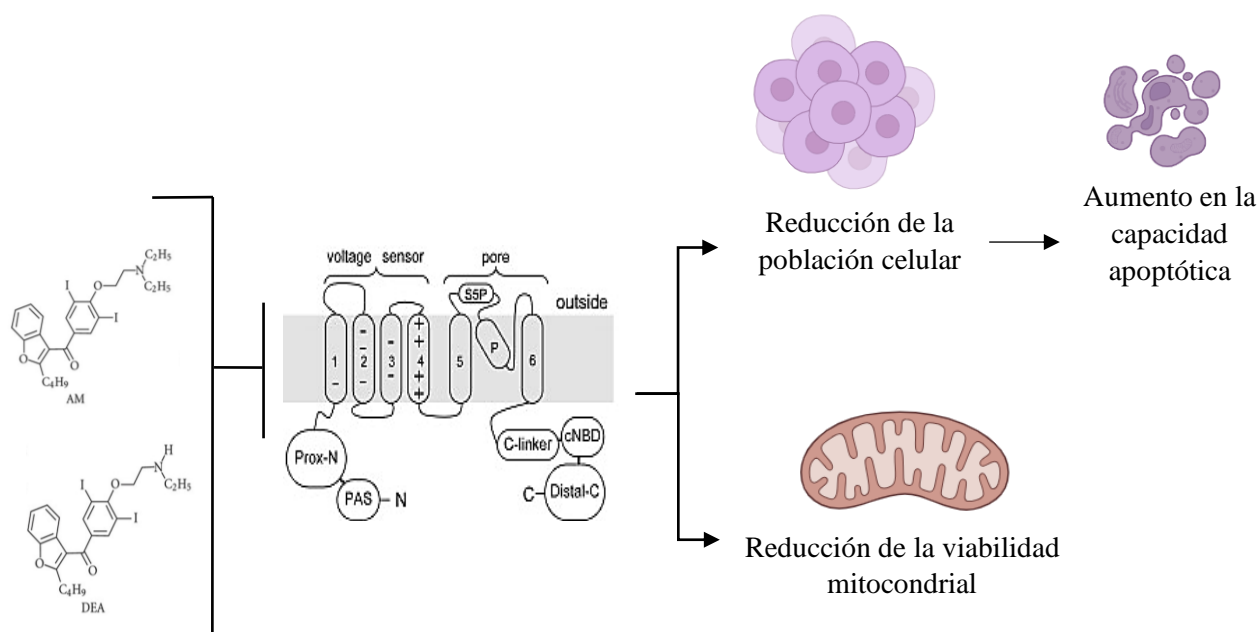
La reducción que induce el tratamiento con AD y DEA en la capacidad proliferativa se ha relacionado con su efecto principalmente en la apoptosis. Se ha reportado que DEA produce la escisión de caspasa-3 y PARP1 a comparación con AD que solo inducen la liberación de proteína A2 requerida a alta temperatura (OMI), citocromo C y factor inductor de la apoptosis (Ramadan et al., 2024). También se ha propuesto que la AD sensibiliza a células tumorales a la apoptosis mediante una desregularización del influjo de calcio a través de la membrana celular favoreciendo estrés crónico del retículo endoplasmático generando una respuesta apoptótica que involucra la sobreexpresión de CHOP y un aumento en la transcripción de DR5, fomentando la activación de otras vías apoptóticas sin afectar a células normales, lo que lo hace un prometedor coadyuvante para el tratamiento convencional del cáncer teniendo un efecto similar a la cafeína y digoxina (Chang et al., 2018; Kim et al., 2011).

Bognar et al., (2017a, 2018) realizaron un ensayo de anexina V en células T24 y HeLa después de ser tratadas con DEA, observaron que el aumento del porcentaje de células en apoptosis está condicionado por el aumento de la concentración de DEA (desde 5 a 15  $\mu\text{M}$ ), además se evaluó la expresión de caspasa-3, Bcl-2 y Bax, identificaron un aumento en la relación Bax/Bcl-2 y un aumento en la actividad de caspasa-3. La vía intrínseca o mitocondrial puede ser producida por el uso de tratamientos farmacológicos, entre otros factores. Donde una reducción de Bcl-2, favorece la introducción de Bax/Bak en la membrana mitocondrial produciendo la liberación del citocromo C al citosol. El citocromo C se adhiere a Apaf-1 y a procaspasa-9 produciendo el apoptosoma. El apoptosoma activa a la caspasa 9 (caspasa iniciadora) y posteriormente activa la caspasa 3 (caspasa ejecutora) que desencadena la apoptosis (Jan, R. et al., 2019).

Las mitocondrias se consideran principalmente los centros productores de energía, en el cáncer existen alteraciones del ADN mitocondrial (mtDNA) lo que impulsa la reprogramación metabólica, metástasis y resistencia a la quimioterapia (Guerra et al., 2017). Se ha reportado anteriormente que el uso de AD protege a mitocondrias provenientes del hígado y tejidos cardiacos hasta una dosis 10  $\mu\text{M}$ , mientras que DEA no mostró ninguna protección (Varbiro et al., 2003), a pesar de esta diferencia, ambos fármacos se siguen considerando candidatos prometedores. Alteración en el potencial de membrana mitocondrial, fragmentación mitocondrial es un indicio de apoptosis temprana acompañado de una

disminución significativa de ATP mitocondrial, lo que promueve una reducción de la viabilidad y crecimiento celular (Ramadan, 2024).

A pesar de que los resultados son alentadores existen limitaciones en este estudio, por lo que para validar completamente el potencial de AD y DEA como agentes terapéuticos para el cáncer de pulmón se necesitan más ensayos *in vitro* e *in vivo*. Además de elucidar por completo los mecanismos por los cuales median su efecto en la proliferación y apoptosis.



**Figura 24.** Diagrama de resultados obtenidos con el tratamiento de AD y DEA

## 9. CONCLUSIONES

1. Las células A549 expresan el ARNm del canal KCNH1.
2. El tratamiento con AD y DEA no modifica la capacidad migratoria de la línea celular A549.

3. AD y DEA reducen la capacidad proliferativa de las células A549, reduciendo el nivel de expresión del ARNm que codifica para la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y produciendo una clara tendencia al alza en la expresión de Bax.
4. AD y DEA induce apoptosis intrínseca, alterando la integridad mitocondrial de las células A549.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Acosta Reynoso, Idania María, Remón Rodríguez, Laritza, Segura Peña, Roger, Ramírez Ramírez, Gisela, & Carralero Rivas, Ángel. (2016). Factores de riesgo en el cáncer de pulmón. *Correo Científico Médico*, 20(1), 42-55. Recuperado en 15 de enero de 2025, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1560-43812016000100005&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1560-43812016000100005&lng=es&tlng=es).

Alatorre Alexander, Jorge & Santillan-Doherty, Patricio & Martínez-Barrera, Luis & Rodríguez-Cid, Jerónimo & Sánchez-Ríos, Carla. (2019). Descripción clínico-epidemiológica y molecular del cáncer de pulmón en un centro de referencia nacional. *NCT Neumología y Cirugía de Tórax*. 78. 356-362. 10.35366/NT194D.

Almendral Garrote, Jesús. Marín Huerta Emilio, Medina Moreno Olga, Peinado Peinado Rafael, Pérez Álvarez, Luisa. Ruiz Granell, Ricardo Viñolas Prat X (2014). Guías de práctica clínica de la Sociedad Española de Cardiología en prevención cardiovascular y rehabilitación cardíaca. *Soc española Cardiol*. 2014:1095-1120.

American Cancer Society (2019). Factores de riesgo para el cáncer de pulmón. Recuperado el 14 de agosto de 2024. <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-pulmon/causas-riesgos-prevencion/factores-de-riesgo.html>

American Cancer Society (2024). About Lung Cancer. Recuperado de <https://www.cancer.org/cancer/types/lung-cancer/about.html>

Anaya-Hernández, Arely & Duran-Pasten, Maria & Rangel, Maricruz & Mercado, Francisco & Almanza, Angelica & Segura, Pedro & Fernández-Peña, Carlos & López, Omar & Gonzalez-Garrido, Antonia & Soto, Enrique & Vega, Rosario & Gamboa, Citlalli & Luis, Enoch. (2023). Canales iónicos: una visión desde la enfermedad.

Bachmann M, Li W, Edwards MJ, Ahmad SA, Patel S, Szabo I, Gulbins E (2020). Voltage-Gated Potassium Channels as Regulators of Cell Death. *Front Cell Dev Biol*. Dec 14;8:611853. doi: 10.3389/fcell.2020.611853. PMID: 33381507; PMCID: PMC7767978.

Balik M, Waldauf P, Maly M, Matousek V, Brozek T, Rulisek J (2019). Efficacy and safety of 1C class antiarrhythmic agent (propafenone) for supraventricular arrhythmias in septic shock compared to amiodarone: protocol of a prospective randomised double-blind study. *BMJ*; 9(9):1-7. <https://bmjopen.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmjopen-2019-031678>

Belur Nagaraj, A., Joseph, P., Kovalenko, O., Wang, Q., Xu, R., & DiFeo, A. (2018). Evaluating class III antiarrhythmic agents as novel MYC targeting drugs in ovarian cancer. *Gynecologic oncology*, 151(3), 525–532.

Bognar Z, Fekete K, Antus C, Hocsak E, Bognar R, Tapodi A, Boronkai A, Farkas N, Gallyas F Jr, Sumegi B, Szanto A (2017a). Desethylamiodarone-A metabolite of amiodarone-Induces apoptosis on T24 human bladder cancer cells via multiple pathways. *PLoS One*. Dec 8;12(12): e0189470. doi: 10.1371/journal.pone.0189470.

Bognar, Z., Cseh, A. M., Fekete, K., Antus, C., Bognar, R., Tapodi, A., Ramadan, F. H. J., Sumegi, B., & Gallyas, F., Jr (2020). Amiodarone's major metabolite, desethylamiodarone inhibits proliferation of B16-F10 melanoma cells and limits lung metastasis formation in an in vivo experimental model. *PloS one*, 15(9), e0239088. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239088>

Bognar, Z., Fekete, K., Antus, C., Hocsak, E., Bognar, R., Tapodi, A., Boronkai, A., Farkas, N., Gallyas, F., Jr, Sumegi, B., & Szanto, A. (2017b). Desethylamiodarone-A metabolite of amiodarone-Induces apoptosis on T24 human bladder cancer cells via multiple pathways. *PloS one*, 12(12), e0189470. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189470>

Bognar, Z., Fekete, K., Bognar, R., Szabo, A., Vass, R. A., & Sumegi, B. (2018). Amiodarone's major metabolite, desethylamiodarone, induces apoptosis in human cervical cancer cells. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 1–8. doi:10.1139/cjpp-2018-0113

Brett C. Bade, Charles S. Dela Cruz (2020). *Epidemiology, Etiology, and Prevention, Clinics in Chest Medicine*, Volume 41, Issue 1, Pages 1-24.

Cabrera Miranda, Luis A., Lozano Ruiz, Francisco J., Blake Cerda, Mónica, Corona Cruz, José F., Sánchez Reyes, Roberto, Pérez Álvarez, Sandra I., Díaz García, Diego A., Álvarez Bojórquez, Mario E., Rivera Márquez, Raúl, López Saucedo, Raúl A., Bolaño Guerra, Laura M., Maldonado Magos, Federico, Aldaco Sarvide, Fernando, Alvarado Zermeño, Adriana, Barajas Figueroa, Luis J., Bautista Aragón, Yolanda, Bolaños Morales, Francina V., Castillo Ortega, Graciano, Félix Leyva, Jesús A., Gerson Cwilich, Raquel, Guzmán de Alba, Enrique, López Galindo, Ángel A., Mariscal Ramírez, Carlos, Piñeiro Retif, Rafael, Ramos Prudencio, Rubí, Rodríguez Cid, Jerónimo, Silva Bravo, Fernando, & Arrieta, Óscar. (2023). Guía de práctica clínica para el manejo del cáncer de pulmón de células pequeñas: enfermedad limitada. *Gaceta mexicana de oncología*, 22(1), 3-23. <https://doi.org/10.24875/j.gamo.22000121>

Capitani, C., Chioccioli Altadonna, G., Santillo, M., & Lastraioli, E. (2023). Ion channels in lung cancer: biological and clinical relevance. *Frontiers in pharmacology*, 14, 1283623. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1283623>

Chaitanya Thandra, K., Barsouk, A., Saginala, K., Sukumar Aluru, J., & Barsouk, A. (2021). Epidemiology of lung cancer. *Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia*, 25(1), 45-52. <https://doi.org/10.5114/wo.2021.103829>

Chang YL, Liu ST, Wang YW, Lin WS, Huang SM. (2018) Amiodarone promotes cancer cell death through elevated truncated SRSF3 and downregulation of miR-224. *Oncotarget*. 9(17):13390-13406. Doi: 10.18632/oncotarget.24385. PMID: 29568365; PMCID: PMC5862586.

Chauffert B, Martin M, Hammann A, Michel MF, Martin F. (1986) Amiodarone-induced enhancement of doxorubicin and 4'-deoxydoxorubicin cytotoxicity to rat colon cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Feb*;46(2):825-30. PMID: 3940645.

Comisión Nacional contra las adicciones (2020). *Tabaquismo y cáncer de pulmón*. Recuperado de <https://www.gob.mx/salud/conadic/articulos/tabaquismo-y-cancer-de-pulmon>

De Groot PM, Wu CC, Carter BW, Munden RF. (2018). The epidemiology of lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*.7(3):220-233. doi: 10.21037/tlcr.2018.05.06. PMID: 30050761; PMCID: PMC6037963.

Delgado RM, Rodríguez MAA.(2018). Funciones no-canónicas de los canales de potasio activados por voltaje. *Rev Educ Bioquímica*;37(2):41-47.

- Dingemans AMC, Früh M, Ardizzoni A, Besse B, Faivre-Finn C, -Hendriks LE, et al. (2021). Small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 32(7):839-53.
- Dubin S, Griffin D.(2020). Lung Cancer in Non-Smokers. *Mo Med*. g:117(4):375-379. PMID: 32848276; PMCID: PMC7431055.
- Dueñas-Cuellar, R. A., Santana, C. J. C., Magalhães, A. C. M., Pires, O. R., Jr, Fontes, W., & Castro, M. S. (2020). Scorpion Toxins and Ion Channels: Potential Applications in Cancer Therapy. *Toxins*, 12(5), 326. <https://doi.org/10.3390/toxins12050326>
- ESMO (2019). ¿Qué es el Cáncer de Pulmón de Células No pequeñas? Recuperado de [www.esmo.org](http://www.esmo.org)
- Florek, J. B., Lucas, A., & Girzadas, D. (2023). Amiodarone. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Gallegos Hernández J. F. (2020). Head & neck cancer. Its impact on the history of mankind. *Cáncer de cabeza y cuello. Su impacto en la historia de la humanidad. Gaceta medica de Mexico*, 156(2), 103–108. <https://doi.org/10.24875/GMM.M20000350>
- Gao S, Wang W, Ye W, Wang K. (2022). The mechanism study of Eag1 potassium channel in gastric cancer. *Transl Cancer*.11(10):3827-3840. doi: 10.21037/tcr-22-2276. PMID: 36388037; PMCID: PMC9641135.
- Gao, Y., Dorn, P., Liu, S. et al. (2019). Cisplatin-resistant A549 non-small cell lung cancer cells can be identified by increased mitochondrial mass and are sensitive to pemetrexed treatment. *Cancer Cell Int* 19, 317. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-1037-1>
- Global Cancer Observatory: Cancer Today (GLOBOCAN) (2022). Recuperado de <https://gco.iarc.fr/en>
- Goldschen Ohm, M. P., & Chanda, B. (2017). SnapShot: Channel Gating Mechanisms. *Cell*, 170(3), 594–594.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.019>
- Goldschlager, N., Epstein, A. E., Naccarelli, G. V., Olshansky, B., Singh, B., Collard, H. R., Murphy, E., & Practice Guidelines Sub-committee, North American Society of Pacing and Electrophysiology (HRS) (2007). A practical guide for clinicians who treat patients with amiodarone: 2007. *Heart rhythm*, 4(9), 1250–1259. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2007.07.020>
- Gomez-Lagunas, F., Barriga-Montoya, C. & Pardo, J.P (2024). State-independent inhibition of the oncogenic Kv10.1 channel by desethylamiodarone, a comparison with amiodarone. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 476, 323–335.
- Grizel, A. V., Glukhov, G. S., & Sokolova, O. S. (2014). Mechanisms of activation of voltage-gated potassium channels. *Acta naturae*, 6(4), 10–26.
- Hamilton, D., Nandkeolyar, S., Lan, H., Desai, P., Evans, J., Hauschild, C., ... Hilliard, A. (2020). Amiodarone: A Comprehensive Guide for Clinicians. *American Journal of Cardiovascular Drugs*. doi:10.1007/s40256-020-00401-5
- Hanahan D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hemmerlein, B., Weseloh, R. M., Mello de Queiroz, F., Knötgen, H., Sánchez, A., Rubio, M. E., Martin, S., Schliephacke, T., Jenke, M., Heinz-Joachim-Radzun, Stühmer, W., & Pardo, L. A. (2006). Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours. *Molecular cancer*, 5, 41. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-5-41>
- Hernández Reséndiz, I., Pacheu Grau, D., Sánchez, A., & Pardo, L. A. (2020). Inhibition of Kv10.1 Channels Sensitizes Mitochondria of Cancer Cells to Antimetabolic Agents. *Cancers*, 12(4), 920.

- Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of physiology*, 117(4), 500–544. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1952.sp004764>
- 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 (Thousand Oaks, Calif.)*, 22(12), 1618–1626. <https://doi.org/10.1177/1933719115590665>
- INEGI (2024). *Estadísticas a propósito del día mundial contra el Cáncer*.
- Jan, R., & Chaudhry, G. E. (2019). Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 9(2), 205–218. <https://doi.org/10.15171/apb.2019.024>
- Jia, P. L., Zhang, C., Yu, J. J., Xu, C., Tang, L., & Sun, X. (2018). The risk of lung cancer among cooking adults: a meta-analysis of 23 observational studies. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 144(2), 229–240. <https://doi.org/10.1007/s00432-017-2547-7>
- Kanwal, M., Ding, X. J., & Cao, Y. (2017). Familial risk for lung cancer. *Oncology letters*, 13(2), 535–542. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5518>
- Ketchem, C. J., Kucera, C., Barve, A., & Beverly, L. J. (2018). The Antiarrhythmic Drug, Amiodarone, Decreases AKT Activity and Sensitizes Human Acute Myeloid Leukemia Cells to Apoptosis by ABT-263. *The American journal of the medical sciences*, 355(5), 488–496. <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2018.01.011> Steinberg, E., Fluksman, A., Zemmour, C. et al. La amiodarona en dosis bajas reduce el crecimiento tumoral y la angiogénesis. *Sci Rep* 10, 18034 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75142-1>.
- Kim IY, Kang YJ, Yoon MJ, Kim EH, Kim SU, Kwon TK, Kim IA, Choi KS (2011). Amiodarone sensitizes human glioma cells but not astrocytes to TRAIL-induced apoptosis via CHOP-mediated DR5 upregulation. *Neuro Oncol.* 13(3):267-79. doi: 10.1093/neuonc/noq195. Epub 2011 Feb 3. PMID: 21292685; PMCID: PMC3064603.
- Kim, I. Y., Kang, Y. J., Yoon, M. J., Kim, E. H., Kim, S. U., Kwon, T. K., Kim, I. A., & Choi, K. S. (2011). Amiodarone sensitizes human glioma cells but not astrocytes to TRAIL-induced apoptosis via CHOP-mediated DR5 upregulation. *Neuro-oncology*, 13(3), 267–279. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noq195>
- Krieghoff-Henning, E., Folkerts, J., Penzkofer, A., & Weg-Remers, S. (2017). *Cáncer: una visión general. Krebs – ein Überblick. Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten*, 40(2), 48–54.
- Kuang, Q., Purhonen, P., & Hebert, H. (2015). Structure of potassium channels. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 72(19), 3677–3693. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1948-5>
- Li, H., Kim, HS, Kim, HW et al. (2016). El agente antiarrítmico de clase III, amiodarona, inhibe los canales de K + dependientes de voltaje en las células del músculo liso de la arteria coronaria de conejo. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 389, 713–721. <https://doi.org/10.1007/s00210-016-1232-8>.
- Li, L. T., Jiang, G., Chen, Q., & Zheng, J. N. (2015). Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Molecular medicine reports*, 11(3), 1566–1572. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2914>
- Li, L. T., Jiang, G., Chen, Q., & Zheng, J. N. (2015). Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Molecular medicine reports*, 11(3), 1566–1572. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2914>
- Li, Z., Zhu, K., Gong, X., Vasilescu, S., Sun, Y., Hong, K., Li, H., Li, L., & Shan, Y. (2017). Inducing Polyclonal *Eag1*-Specific Antibodies by Vaccination with a Linear Epitope Immunogen and Its Relation to Breast Tumorigenesis. *Pathology oncology research : POR*, 23(4), 761–767. <https://doi.org/10.1007/s12253-016-0158-2>

Lörinczi E, Helliwell M, Finch A, Stansfeld PJ, Davies NW, Mahaut-Smith M, Muskett FW, Mitcheson JS. (2016). Calmodulin Regulates Human Ether à Go-Go 1 (hEAG1) Potassium Channels through Interactions of the Eag Domain with the Cyclic Nucleotide Binding Homology Domain. *J Biol Chem.* 19;291(34):17907-18. doi: 10.1074/jbc.M116.733576. Epub 2016 Jun 20. PMID: 27325704; PMCID: PMC5016179.

Luis, E., Anaya-Hernández, A., León-Sánchez, P., & Durán-Pastén, M. L. (2022). The Kv10.1 Channel: A Promising Target in Cancer. *International journal of molecular sciences*, 23(15), 8458. <https://doi.org/10.3390/ijms23158458>

Malhotra, J., Malvezzi, M., Negri, E., La Vecchia, C., & Boffetta, P. (2016). Risk factors for lung cancer worldwide. *European Respiratory Journal*, 48(3), 889–902. doi:10.1183/13993003.00359-2016

Martínez, R., Stühmer, W., Martin, S., Schell, J., Reichmann, A., Rohde, V., & Pardo, L. (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. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1848-y>

Miron, O., Afrasanie, V. A., Paduraru, M. I., Trandafir, L. M., & Miron, L. (2020). The relationship between chronic lung diseases and lung cancer – a narrative review. *Journal of B.U.ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology*, 25(4), 1687–1692.

Morais-Cabral, J. H., & Robertson, G. A. (2015). The enigmatic cytoplasmic regions of KCNH channels. *Journal of molecular biology*, 427(1), 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.08.008>

Moreels, L., Peigneur, S., Galan, D. T., De Pauw, E., Béress, L., Waelkens, E., Pardo, L. A., Quinton, L., & Tytgat, J. (2017). APETx4, a Novel Sea Anemone Toxin and a Modulator of the Cancer-Relevant Potassium Channel K10.1. *Marine drugs*, 15(9), 287. <https://doi.org/10.3390/md15090287V>

National Cancer Institute (2024). Cáncer de pulmón—Versión para profesionales de salud. Recuperado de <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/pulmon/pro>

National Cancer Institute (NCI) (2025) Non-Small Cell Lung Cancer Treatment (PDQ®)—Health Professional Version. Recuperado de Non-Small Cell Lung Cancer Treatment (PDQ®) - NCI

National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 104774, Desethylamiodarone. Retrieved October 17, 2024 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Desethylamiodarone>.

Neher, E., Sakmann, B., & Steinbach, J. H. (1978). The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 375(2), 219–228. <https://doi.org/10.1007/BF00584247>

Nerbonne, J. M. (2016). Functional and Molecular Diversity of Native Neuronal K<sup>+</sup> Channels. *eLS*, 1–12. doi:10.1002/9780470015902.a0000049

OMS (2023). Lung Cancer. Recuperado el 25 de abril de 2024, de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/lung-cancer>

Organización Mundial de la Salud (OMS) (2022). Recuperado el 25 de abril de 2024, de <https://www.who.int/es/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>

Organización Panamericana de la Salud / OMS (2023). Recuperado el 25 de abril de 2024 de <https://www.paho.org/es/temas/cancer#:~:text=El%20c%C3%A1ncer%20es%20una%20de,de%20edad%20%20m%C3%A1s%20j%C3%B3venes.>

Quadid-Ahidouch, H., Ahidouch, A., & Pardo, L. A. (2016). Kv10.1 K(+) channel: from physiology to cancer. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 468(5), 751–762. <https://doi.org/10.1007/s00424-015-1784-3>

Pardo LA, del Camino D, Sánchez A, Alves F, Brüggemann A, Beckh S, Stühmer W (1999). Oncogenic potential of EAG K(+) channels. *EMBO J*. 18(20):5540-7. doi: 10.1093/emboj/18.20.5540. PMID: 10523298; PMCID: PMC1171622.

Prevarskaya, N., Skryma, R., & Shuba, Y. (2018). Ion Channels in Cancer: Are Cancer Hallmarks Oncochannelopathies?. *Physiological reviews*, 98(2), 559–621. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2016>

Qiwen Huang, Weisheng Zhu, Xiaoyin Gao, Xiping Liu, Zhijun Zhang, Bengang Xing. (2023). Nanoparticles-mediated ion channels manipulation: From their membrane interactions to bioapplications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Volume 195,2023,114763, ISSN 0169-409X,

Ramadan, F. H. J., Koszegi, B., Vantus, V. B., Fekete, K., Kiss, G. N., Rizsanyi, B., Bogнар, R., Gallyas, F., Jr., & Bogнар, Z. (2024). Comparison of Mitochondrial and Antineoplastic Effects of Amiodarone and Desethylamiodarone in MDA-MB-231 Cancer Line. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(18), 9781. <https://doi.org/10.3390/ijms25189781>

Ramadan, F. H. J., Koszegi, B., Vantus, V. B., Fekete, K., Kiss, G. N., Rizsanyi, B., Bogнар, R., Gallyas, F., Jr., & Bogнар, Z. (2024). Comparison of Mitochondrial and Antineoplastic Effects of Amiodarone and Desethylamiodarone in MDA-MB-231 Cancer Line. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(18), 9781. <https://doi.org/10.3390/ijms25189781>

Ranjan, R., Logette, E., Marani, M., Herzog, M., Tâche, V., Scantamburlo, E., Buchillier, V., & Markram, H. (2019). A Kinetic Map of the Homomeric Voltage-Gated Potassium Channel (Kv) Family. *Frontiers in cellular neuroscience*, 13, 358. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00358>

Rodríguez Martínez, Ángeles & Ruano-Ravina, Alberto & Torres, Maria & Vidal-García, Iria & Fernández, Virginia & Hernández-Hernández, Jesús & García-García, Silvia & Provencio, Mariano & Castro-Añón, Olalla & Parente-Lamelas, Isaura & Abdulkader Nallib, Ihab & Abal-Arca, José & Montero-Martínez, Carmen & Amenedo, Margarita & Guzmán-Taveras, Rosirys & Fernández-Villar, Alberto & Barros-Dios, Juan. (2017). Cáncer de pulmón microcítico. Metodología y resultados preliminares del estudio SMALL CELL. *Archivos de Bronconeumología*. 53. 10.1016/j.arbres.2017.04.016.

Romeo, H. E., & Barreiro Arcos, M. L. (2023). Clinical relevance of stem cells in lung cancer. *World journal of stem cells*, 15(6), 576–588. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v15.i6.576>

Roux B. (2017). Ion channels and ion selectivity. *Essays in biochemistry*, 61(2), 201–209. <https://doi.org/10.1042/EBC20160074>

Sánchez Ríos, Carla Paola, Rodríguez-Cid, Jerónimo Rafael, Martínez-Barrera, Luis Manuel, Santillán-Doherty, Patricio, & Alatorre-Alexander, Jorge Arturo. (2019). Descripción clínico-epidemiológica y molecular del cáncer de pulmón en un centro de referencia nacional. *Neumología y cirugía de tórax*, 78(4), 356-362. Epub 06 de agosto de 2021. Recuperado en 15 de enero de 2025, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0028-37462019000400356&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0028-37462019000400356&lng=es&tlng=es).

Siddoway L. A. (2003). Amiodarone: guidelines for use and monitoring. *American family physician*, 68(11), 2189–2196.

Singh T, Hassanabad MF, Hassanabad AF (2021). “Cáncer de pulmón de células no pequeñas: agentes inmunoterapéuticos y de diana molecular emergentes”. *Biochim Biophys Acta-Rev Cáncer* 1876 (2): 34. Doi: 10.1016/j.bbcan.2021.188636

Steinberg, E., Fluksman, A., Zemmour, C., Tischenko, K., Karsch-Bluman, A., Brill-Karniely, Y., Birsner, A. E., D'Amato, R. J., & Benny, O. (2020). Low dose amiodarone reduces tumor growth and angiogenesis. *Scientific*

- reports, 10(1), 18034. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75142-1> Suhail, Y., Cain, M. P., Vanaja, K., Kurywchak, P. A., Levchenko, A., Kalluri, R., & Kshitiz (2019). *Systems Biology of Cancer Metastasis*. *Cell systems*, 9(2), 109–127. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2019.07.003>.
- Toplak, Ž., Hendrickx, L. A., Gubič, Š., Možina, Š., Žegura, B., Štern, A., Novak, M., Shi, X., Peigneur, S., Tytgat, J., Tomašič, T., Pardo, L. A., & Mašič, L. P. (2021). 3D Pharmacophore-Based Discovery of Novel KV10.1 Inhibitors with Antiproliferative Activity. *Cancers*, 13(6), 1244. <https://doi.org/10.3390/cancers13061244>
- Travis WD, Bambrilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG (2015). *WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart, 4th edn*. IARC WHO Classification of Tumours 2015: World Health Organization
- Varbiro G., Toth, A., Tapodi, A., Bognar, Z., Veres, B., Sumegi, B., Gallyas, F., Jr (2003). Protective effect of amiodarone but not N-desethylamiodarone on postischemic hearts through the inhibition of mitochondrial permeability transition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307, 615–625.
- Wang, X., Chen, Y., Zhang, Y., Guo, S., Mo, L., An, H., & Zhan, Y. (2017). *Eag1 Voltage-Dependent Potassium Channels: Structure, Electrophysiological Characteristics, and Function in Cancer*. *The Journal of Membrane Biology*, 250(2), 123–132. doi:10.1007/s00232-016-9944-8
- Warren, G. W., & Cummings, K. M. (2013). *Tobacco and lung cancer: risks, trends, and outcomes in patients with cancer*. American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting, 359–364. [https://doi.org/10.14694/EdBook\\_AM.2013.33.359](https://doi.org/10.14694/EdBook_AM.2013.33.359)
- Weng, J., Chen, H., Wu, H., Tu, M., Wang, Z., Chen, D., ... Chen, C. (2018). Amiodarone induces epithelial-mesenchymal transition in A549 cells via activation of TGF-β1. *Drug and Chemical Toxicology*, 1–8. doi:10.1080/01480545.2018.1497055
- Whicher JR, MacKinnon R (2016). Structure of the voltage-gated K<sup>+</sup> channel Eag1 reveals an alternative voltage sensing mechanism. *Science*. 2016 Aug 12;353(6300):664-9. doi: 10.1126/science.aaf8070. PMID: 27516594; PMCID: PMC5477842.
- Whicher, J. R., & MacKinnon, R. (2019). Regulation of Eag1 gating by its intracellular domains. *eLife*, 8, E49188. <https://doi.org/10.7554/eLife.49188>
- Wu, X., Chen, Z., Zeng, W., Zhong, Y., Liu, Q., & Wu, J. (2015). Silencing of Eag1 Gene Inhibits Osteosarcoma Proliferation and Migration by Targeting STAT3-VEGF Pathway. *BioMed research international*, 2015, 617316. <https://doi.org/10.1155/2015/617316>
- Xia, C., Liu, C., Ren, S., Cai, Y., Zhang, Q., & Xia, C. (2023). Potassium channels, tumorigenesis and targeted drugs. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 162, 114673. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114673>
- Xue, Y., Jiang, Y., Jin, S., & Li, Y. (2016). Association between cooking oil fume exposure and lung cancer among Chinese nonsmoking women: a meta-analysis. *OncoTargets and therapy*, 9, 2987–2992. <https://doi.org/10.2147/OTT.S100949>
- Yin, X., Zhu, Z., Hosgood, H. D., Lan, Q., & Seow, W. J. (2020). Reproductive factors and lung cancer risk: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *BMC public health*, 20(1), 1458. <https://doi.org/10.1186/s12889-020-09530-7>
- Zappa, C., & Mousa, S. A. (2016). Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Translational lung cancer research*, 5(3), 288–300. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2016.06.07>