

2020

Evaluación de la expresión de Kv10.1 y p53 en las células SiHa durante la generación de resistencia a cisplatino

María Catalina Rangel Ardila
Universidad de La Salle, Bogotá

María Camila López Castiblanco
Universidad de La Salle, Bogotá

Follow this and additional works at: <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia>



Part of the [Biology Commons](#)

Citación recomendada

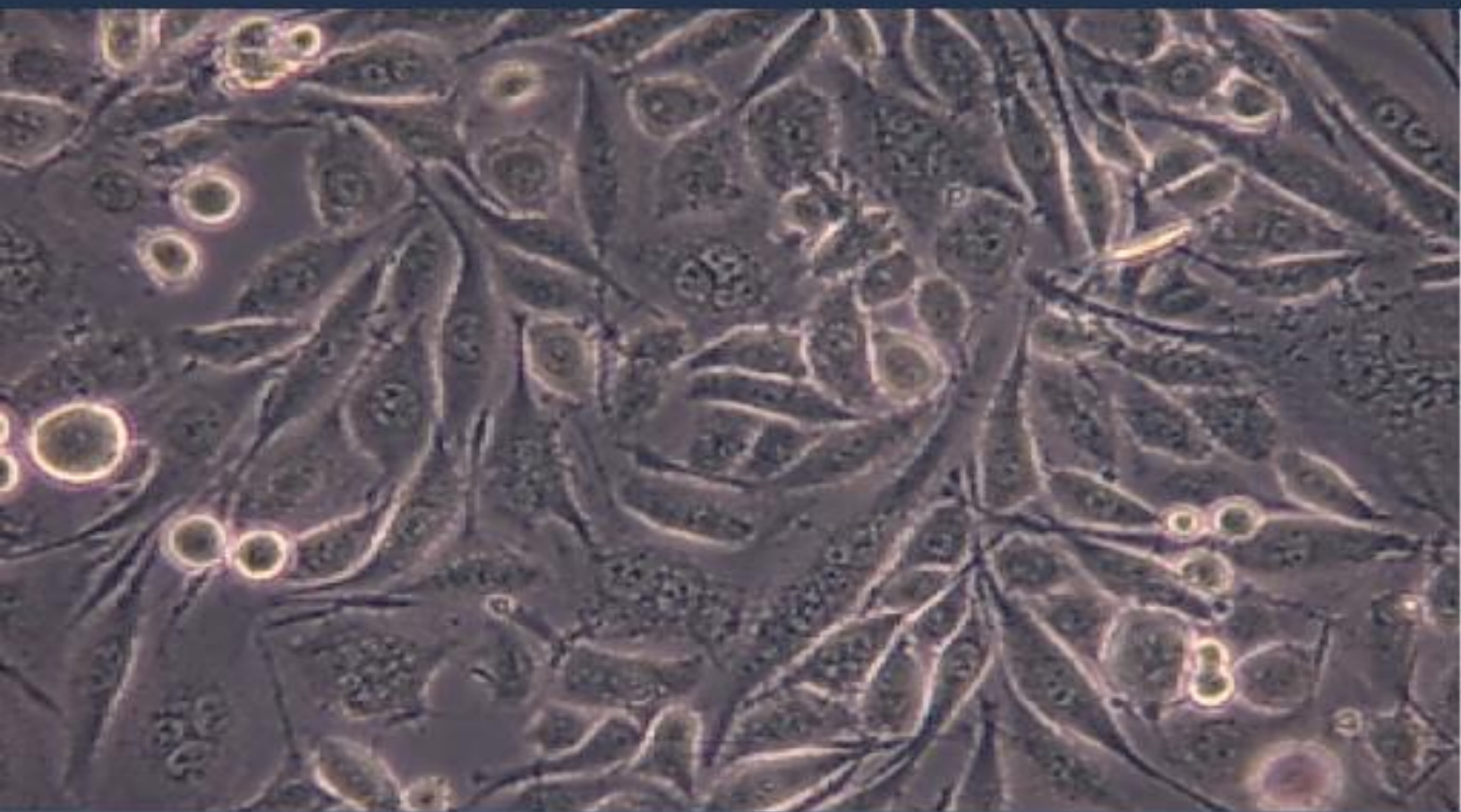
Rangel Ardila, M. C., & López Castiblanco, M. C. (2020). Evaluación de la expresión de Kv10.1 y p53 en las células SiHa durante la generación de resistencia a cisplatino. Retrieved from <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia/71>

This Trabajo de grado - Pregrado is brought to you for free and open access by the Departamento de Ciencias Básicas at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Biología by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.



UNIVERSIDAD DE LA SALLE
Departamento de Ciencias Básicas
Biología

Evaluación De La Expresión De
Kv10.1 y p53 En Las Células SiHa
Durante La Generación De
Resistencia a Cisplatino



María Catalina Rangel Ardila
María Camila López Castiblanco

Tutor: Yenny Yolanda Lozano
Cotutor: Josefa Antonia Rodríguez

DEDICATORIA

Dedicamos de manera especial este trabajo a nuestras familias, por el apoyo y paciencia brindados a lo largo de la carrera, por estar presentes en el desarrollo de esta tesis y por ser la motivación más grande para terminarla.

A nuestros compañeros de biología y de laboratorio por hacer más amena esta etapa universitaria, por animarnos en momentos difíciles y celebrar con nosotras los buenos resultados.

A los laboratoristas de ciencias básicas, pues su trabajo y compañía fueron parte fundamental del desarrollo de este trabajo. Gracias por su tiempo y dedicación.

Finalmente, a nuestros profesores quienes se encargaron de brindarnos el conocimiento y la inspiración para realizar nuestra tesis. Gracias por sus enseñanzas, correcciones y consejos.

María Catalina Rangel

María Camila López

RESUMEN

El cáncer de cuello uterino es de las patologías con mayor incidencia en mujeres, el tratamiento convencional incluye la administración de quimioterapia combinada basada en cisplatino; sin embargo, la resistencia adquirida es un factor limitante para el éxito del tratamiento. Para hacerle frente a la problemática se ha tenido el interés de encontrar nuevos blancos que permitan evidenciar el desarrollo de resistencia a tiempo. Las proteínas Kv10.1 y p53 son de importancia debido a que la primera se sobreexpresa en diferentes modelos tumorales y la segunda es un determinante directo de quimiosensibilidad al cisplatino que se han relacionado previamente. Este estudio pretende conocer la variación en la expresión de las proteínas Kv10.1 y p53 en células de cáncer de cuello uterino SiHa (VPH16) durante el proceso de generación de resistencia al cisplatino. Las células SiHa se cultivaron mientras eran expuestas a diferentes dosis de cisplatino, a continuación, se realizaba la extracción de proteína total y se evaluaban cambios en la expresión mediante ensayos de Dot blot. Se encontró una disminución significativa en la expresión de las proteínas Kv10.1 y p53 en dos estadios de resistencia y se evidenciaron cambios morfológicos en las células en cada estadio de resistencia.

Palabras Clave: Canal de potasio Kv10.1, Células SiHa, P53, Resistencia a cisplatino.

ABSTRACT

Cervical cancer is one of the pathologies with the highest incidence in women and the conventional treatment includes the administration of combined chemotherapy based on cisplatin; However, acquired resistance is a limiting factor for the success of the treatment. To deal with this problem, we have had the interest of finding new targets that allow us to show the development of resistance in time. The Kv10.1 and p53 proteins are important because the first one is overexpressed in different tumor models and the second one is a direct determinant of cisplatin chemosensitivity that have been previously related. This study pretends to know the variation in the expression of Kv10.1 and p53 proteins in cervical cancer cells SiHa (HPV16) during the process of generating resistance to cisplatin. SiHa cells were cultured while exposed to different doses of cisplatin, then total protein extraction was performed and changes in expression were evaluated by Dot blot assays. A significant decrease in the expression of the Kv10.1 and p53 proteins was found in two stages of resistance and morphological changes were evident in the cells at each stage of resistance.

Keywords: Cisplatin resistance, P53, Potassium channel Kv10.1, SiHa cells.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial el cáncer del cuello uterino es la causa más frecuente de morbilidad y mortalidad por cáncer ginecológico y la cuarta causa de muerte en mujeres diagnosticadas con cáncer (Gómez, *et al.* 2010), siendo responsable de aproximadamente 530.000 casos nuevos y 250.000 muertes anuales (Rakotomahenina, *et al.* 2016). Las mayores tasas de mortalidad a causa de esta patología se presentan en países subdesarrollados debido a la falta de acceso a los servicios de salud y educación, sumado a otros factores como el inicio de la vida sexual y primer parto antes de los 18 años, múltiples partos a lo largo de la vida, baja ingesta de vitaminas y coinfecciones con agentes tales como el virus de Inmunodeficiencia Humana (HIV), Chlamydia trachomatis y el virus de Papiloma Humano (VPH), siendo este último considerado como el agente etiológico del cáncer de cuello uterino a pesar de ser un factor necesario pero no suficiente para el desarrollo de esta enfermedad (Small, *et al.* 2017). En Colombia, el cáncer de cuello uterino ocupa el segundo lugar en mortalidad femenina después del cáncer de mama (Gómez y Martínez, 2017); y como parte del control integral en la población colombiana, se han implementado pruebas de tamizaje como la citología, pruebas de detección del ADN viral y estrategias de vacunación; sin embargo, el bajo impacto de los programas de tamizaje deriva en una alta incidencia de estadios avanzados (Gamboa y Murillo, 2016), por lo cual el cáncer de cuello uterino continúe siendo un problema de salud pública en nuestro país.

La enfermedad es el resultado de una infección persistente a largo plazo en el tracto genital inferior por uno de los 15 tipos de VPH de alto riesgo. Los serotipos 16 y 18 son los responsables de más del 70% de los casos, mientras que los tipos 31, 33, 45, 52 y 58 representan aproximadamente el 20% de los casos (Flores-Miramontes, *et al.* 2015). Debido a la asociación ya comprobada entre la presencia del virus y el desarrollo de la enfermedad, se generó la vacuna como método de prevención, y teniendo en cuenta que el VPH tiene un papel fundamental en la carcinogénesis cervical, se desarrollaron pruebas para la detección del ADN viral que permita un enfoque más preciso para la prevención de la enfermedad (Small, *et al.* 2017).

Una vez detectada la enfermedad, la elección del tratamiento requiere conocer la etapa en la que se encuentra el cáncer, siendo los estadios avanzados y los cánceres recurrentes y/o metastáticos los que requieren la administración de quimio fármacos para controlar la enfermedad (Penson, *et al.* 2015). Adicionalmente la edad de la paciente y su deseo de preservar o no la fertilidad también interfieren en la determinación del tratamiento a seguir. Las lesiones precancerosas son tratadas con un procedimiento quirúrgico de citorreducción (Serman, 2002). En los casos de cáncer, si los bordes quirúrgicos conservan células tumorales se continua el tratamiento con cisplatino y radioterapia concomitante (Rahaman, *et al.* 2009). En las etapas avanzadas se requiere la administración de combinaciones de compuestos de platino como cis y carboplatino. Aunque muchas pacientes responden a este tratamiento, pocas se curan debido a que las células cancerígenas desarrollan resistencia al medicamento (Stewart, *et al.* 2006a).

El cisplatino o cis-diamminedichloroplatinum (II) es un quimio fármaco efectivo para el tratamiento de tumores sólidos como el de cuello uterino y actualmente es el tratamiento de

elección contra distintos tipos de cáncer, a pesar del evidente desarrollo de resistencia y de los efectos adversos en los pacientes (Dasari y Tchounwou, 2014); su efecto citotóxico se debe a la formación de aductos con el ADN, induciendo entrecruzamientos que afectan la estructura normal de la doble hélice (Jamieson y Lippard, 1999), e interfieren con el proceso de transcripción inhibiendo los mecanismos de replicación del ADN y promoviendo la muerte celular por apoptosis (Dasari y Tchounwou, 2014; Fuertes *et al.* 2003). Sin embargo, se ha registrado que posterior al tratamiento quimioterapéutico, un tercio de las pacientes desarrollan resistencia al fármaco, al igual que la totalidad de las mujeres que presentan recurrencia de la enfermedad (Stewart, *et al.* 2006a), por lo cual, el porcentaje de pacientes que se curan es bajo (María, *et al.* 2018), siendo la resistencia sobre las células tumorales, uno de los factores limitantes en el éxito terapéutico (Sakamoto, *et al.* 2001).

La resistencia a cisplatino y a otros quimio fármacos se relaciona directamente con el estadio de progresión del tumor debido a que las células cancerígenas adquieren alteraciones genéticas adicionales que les confieren ventajas de crecimiento a medida que proliferan y en consecuencia, no se produce el efecto citotóxico o citostático esperado (María, *et al.* 2018). Estudios realizados por Zhu K, *et al.* (2005) y Stewart J, *et al.* (2006) demuestran que existe una expresión diferencial de proteínas entre las células tumorales resistentes y sensibles a cisplatino, ambos autores sugieren que las proteínas que se sobreexpresan en las células resistentes, podrían estar relacionadas con el desarrollo de la resistencia al medicamento (Stewart, *et al.* 2006; Zhu, *et al.* 2005). Stewart J, *et al.* (2006) concluyen que las proteínas involucradas en el transporte de iones, específicamente los canales iónicos, pueden jugar un papel importante en la regulación de la concentración de cisplatino en las células, lo que puede generar un fenotipo resistente o sensible al tratamiento (Stewart, *et al.* 2006). Una idea similar se planteó por Fuertes MA, *et al.* (2003), quienes postularon la hipótesis que describe la entrada de cisplatino a la célula mediante distintos canales transmembranales (Fuertes, *et al.* 2003); por lo que los canales iónicos desempeñarían un papel importante para determinar la adquisición de resistencia a quimio fármacos.

En la actualidad, se buscan proteínas cuya expresión sea diferencial entre células sensibles y resistentes al tratamiento con cisplatino para su aplicación clínica como biomarcadores de resistencia, que permitan identificar a las pacientes que están desarrollando tumores resistentes al cisplatino con el fin de evitar un manejo terapéutico inadecuado (Perez, 1998). Los canales iónicos, particularmente los de potasio, controlan la homeostasis celular, el potencial de membrana y otras señales que pueden estar implicadas en la biología del tumor promoviendo la angiogénesis, la capacidad de invasión, la diseminación metastásica y demás características de las células cancerígenas (Ohya, *et al.* 2016; Pardo y Stühmer, 2014; Prevarskaya, *et al.* 2010). Estos canales cumplen un rol importante en la inducción de apoptosis debido a que modulan el flujo de entrada y salida de iones K⁺ en la célula. La salida de iones K⁺ reduce el volumen celular lo que promueve la apoptosis; de manera contraria, el ingreso de iones K⁺ la contrarresta (Lang, *et al.* 1998); por lo tanto, la variación en la expresión de canales de potasio y por ende el flujo de iones limitan la eficacia de los agentes quimioterapéuticos proapoptóticos como el cisplatino (Marklund, *et al.* 2001).

Los canales de potasio más estudiados en cáncer por su relación con el desarrollo de resistencia a quimiofármacos son los Kv10.1, también conocidos como KCNH1 (Pardo y Stühmer, 2008). Su expresión se limita a ciertas áreas del cerebro como el hipotálamo, hipocampo y el córtex y se encuentra en pequeñas cantidades en el mioblasto y la placenta (Martínez, *et al.* 2015; Pardo, *et al.* 2005). El incremento de su expresión en cualquier tejido es indicativo de proliferación y transformación maligna (Martínez, *et al.* 2015; Napp *et al.* 2005) puesto que se encuentra expresado en una variedad de líneas celulares derivadas de tumores malignos y en muestras clínicas de diferentes tipos de cáncer (Pardo y Stühmer, 2008; Wadhwa, *et al.* 2009), lo que sugiere que podría ser un blanco para diagnósticos terapéuticos de interés en distintos tipos de cáncer debido a su potencial como biomarcador (Stühmer, 2017; Wadhwa, *et al.* 2009). La expresión de Kv10.1 parece estar controlada por reguladores clave de la proliferación y la supervivencia, tales como la proteína supresora de tumores p53 y el factor de crecimiento E2F1 que a menudo están alterados en el cáncer (Oquadid-Ahidouch, *et al.* 2016); por lo que estas proteínas son conocidas como bioindicadores de la progresión tumoral.

La expresión alterada de las proteínas p53, E2F1 y el microARN miR-34 son algunos de los mecanismos moleculares que inducen la expresión de Kv10.1 en las células cancerígenas (Lin, *et al.* 2011; Pardo y Stühmer, 2014), pero es el factor de crecimiento E2F1 regulado por p53 el que favorece la expresión de Kv10.1. Del mismo modo, el miR-34 al actuar sobre E2F1 promueve una disminución o alteración de p53 y por ende una reducción de miR-34, que causaría un incremento en la expresión de E2F1 resultaría en un aumento de Kv10.1 (Stühmer, 2017).

De acuerdo con lo anterior, la expresión del canal Kv10.1 en células cancerígenas está directamente relacionada con la proteína p53, frecuentemente alterada en células tumorales (Stühmer, 2017). La proteína p53 es una fosfoproteína, cuya activación es debida a estrés celular (hipoxia, daño del ADN por radiación y quimioterapéuticos y sobreexpresión de oncogenes, entre otros). Su respuesta está direccionada a reparar el ADN, generar senescencia y apoptosis para prevenir una proliferación celular inapropiada (Bai y Zhu, 2006).

Adicionalmente, diferentes estudios han demostrado la relación directa entre la expresión alterada de p53 y la resistencia a distintos medicamentos incluyendo cisplatino, lo que sugiere que p53 podría ser usado como un biomarcador para determinar la quimio sensibilidad (Harris y Levine, 2005; Sherr y McCormick, 2002). Estudios de Perego P, *et al.* (1996), demostraron que las mutaciones en el gen p53, alteran la expresión de la proteína p53, resultando en el desarrollo de resistencia a cisplatino, debido a la capacidad de p53 reparar el daño inducido por el quimio fármaco, actuando como un regulador transcripcional que incrementa la eficiencia de la reparación y reduce el efecto citotóxico sobre el ADN dañado (Perego, *et al.* 1996).

Además, como se ilustra en la figura 1, se ha demostrado una relación entre la presencia del virus de papiloma humano con la mutación del gen p53 debido a que las oncoproteínas E6 y E7 del virus afectan directamente a los genes supresores de tumores p53 y retinoblastoma (Rb). La proteína E6 se asocia a p53 e induce su degradación por ubiquitinación. Además, degrada la proteína pro-apoptótica BAK, lo que resulta en resistencia a la apoptosis y el incremento de la inestabilidad cromosómica. Por su parte, la proteína E7 favorece la expresión del factor de

crecimiento E2F1, el cual a su vez influye en la expresión de Kv10.1 y como resultado se altera el ciclo celular, por lo cual, la expresión de los oncogenes virales conduce a la inmortalización en las células de distintos tejidos, al igual que una alteración en la expresión de las proteínas Kv10.1 y p53 (Zur Hausen, 2002; Stühmer, 2017), lo que demuestra la importancia de estudiar estas dos proteínas durante el proceso de adquisición de resistencia a cisplatino en líneas celulares VPH positivo.

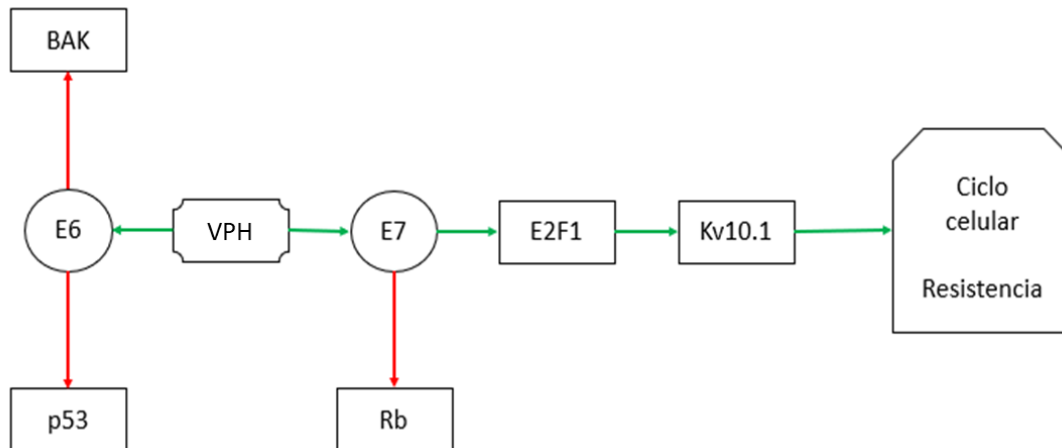


Figura 1. Esquema de interacciones entre algunos componentes que afectan la expresión de Kv10.1 y p53 en presencia del virus de papiloma humano (modificado de Stühmer 2017). Las flechas verdes indican aumento o activación del producto y las flechas rojas disminución o inhibición. VPH: virus de papiloma humano; E6 y E7: proteínas implicadas en la patogénesis de HVP; p53 y Rb: genes supresores de tumores; BAK: proteína pro-apoptótica; Kv10.1: canal de potasio.

Teniendo en cuenta la relación entre la proteína p53 y el canal Kv10.1, esta investigación pretende conocer cómo varía la expresión de las proteínas Kv10.1 y p53 en la línea celular de cáncer de cuello uterino SiHa (VPH-16), durante el proceso de establecimiento de resistencia al quimio fármaco cisplatino con el fin de considerar estas proteínas como posibles biomarcadores de resistencia al cisplatino.

MATERIALES Y MÉTODOS

La línea celular de cáncer de cuello uterino SiHa (VPH-16) fue donada por la Dra. Josefa Rodríguez. Esta se cultivó en medio Dulbecco Modified Eagles Minimal Essential (DMEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino, penicilina y estreptomina al 1%, las células

fueron incubadas a temperatura de 37°C en una atmosfera humidificada con 5% de CO₂. Para corroborar el genotipo VPH-16, presente en la línea celular, se empleó la prueba de genotipificado de VPH Linear Array, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Obtención de células resistentes

Para inducir la resistencia al quimio fármaco, la línea se expuso de manera continua a concentraciones crecientes de cisplatino. Las concentraciones fueron 0.05 µg/ml, 0.1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, según lo descrito por Roy y Mukherjee 2014. Una vez expuestas al cisplatino, las células se incuban hasta alcanzar confluencia superior al 80%, y se incrementaba la concentración del quimio fármaco. El nivel de confluencia se estimó comparando las células observadas antes y durante la exposición al cisplatino y teniendo en cuenta los cambios morfológicos observados en las células, comparándolos con los cambios morfológicos descritos en la literatura para células expuestas a quimiofármacos. Las líneas celulares sin exposición al quimio fármaco o células blanco, se mantuvieron durante este periodo como líneas de control cultivadas en medio Dulbecco's Modification of Eagle's Medium DMEM suplementado.

En cada estadio de resistencia, se crioconservaron alícuotas para generar un stock de las líneas celulares originales y resistentes a cisplatino donde cada muestra corresponde a un estado mayor de resistencia al quimio fármaco.

Identificación de las proteínas Kv10.1 y p53 mediante Dot Blot

Para cada estadio de resistencia se extrajo proteína total empleando buffer de lisis RIPA suplementado con inhibidores de proteasas. Cada extracto fue cuantificado utilizando el método de ácido bicinonínico (BCA) con lectura en espectrofotómetro a 562 nm.

La detección de proteínas se llevó a cabo mediante la técnica de Dot Blot basándonos en el protocolo utilizado por David Stott (Stott 2000). En recuadros de membrana de nitrocelulosa ubicados en una caja de 24 pozos, se sembraron directamente 8, 4, 2, 1 y 0.5 µg/ml del extracto total de proteína y se dejó secar. Seguido a esto, se bloqueó la membrana con 5% de caseína en TBST (0.05% Tween 20) durante 1 h a temperatura ambiente y se incubó durante 2 horas con los respectivos anticuerpos para identificar cada proteína. Se emplearon los anticuerpos monoclonales anti-Eag1 (Donado por el Dr. Walter Stümer y Dr. Luis Pardo), anti-p53 (DO-7, Thermo Scientific) y anti GAPDH (Developmental Hybridoma Studies Bank, P4C10, E7-s, and DSHB-hGAPDH-2G7), como control de carga para células SiHa. Finalmente se realizaron los lavados respectivos con el buffer TBST y se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-ratón (Anti-Mouse IgG).

La detección de los Dots se realizó por quimioluminiscencia (SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate de Thermo Scientific) mediante escaneo de imagen utilizando un fotodocumentador de Termofisher (iBrighth FL1000). La intensidad de cada imagen se determinó mediante el software ImageJ seleccionando el área del Dot en el programa y así obteniendo un valor de intensidad calculado al transformar los valores de los pixeles del área seleccionada en valores de brillo.

Análisis estadístico

Cada ensayo se realizó por triplicado, los datos se analizaron con el software R x 64 (Core Team, 2016) y se presentan como la media \pm desviación estándar. Se consideró una $p < 0,05$ para indicar una diferencia estadísticamente significativa.

RESULTADOS

Después de determinar mediante el procedimiento de linear array el serotipo de VPH de la línea celular SiHa, el cual fue VPH-16, se indujo la resistencia a cisplatino en la línea celular SiHa, empleando las 5 concentraciones del fármaco 0.05 $\mu\text{g/ml}$, 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ y 2 $\mu\text{g/ml}$. La generación de dichos estadios de resistencia tardó 30 semanas, tiempo en el cual las células sufrieron cambios morfológicos como: alargamiento, bordes irregulares en las membranas, y aparición de gránulos en el citoplasma (figura 2. B-G), diferenciándose de las células sin exposición a cisplatino, en las cuales no se observaron gránulos en el citoplasma ni alteraciones en su membrana (figura 2.A); sin embargo, dichos cambios fueron progresivos con el incremento de las concentraciones del quimio fármaco; adicionalmente, se evidenció que a mayor dosis se requería mayor tiempo para obtener los fenotipos resistentes.

Con la primera concentración de cisplatino, las células no presentaron grandes cambios morfológicos y se registró una mortalidad celular aproximadamente del 20% de la confluencia total durante los primeros 3 días de exposición (figura 2.B), además, se evidenció la aparición de gránulos en el citoplasma (figura 2.C). Debido a la rápida tolerancia de esta dosis, se aumentó la concentración del fármaco a la semana siguiente. En la dosis 0.1 $\mu\text{g/ml}$ las células permanecieron durante 30 días; en los primeros 3 días se evidenció muerte celular aproximadamente del 70% (figura 2.D), y la tasa de crecimiento disminuyó considerablemente con respecto a las células sin estímulo. Los cambios morfológicos se evidenciaron en los primeros 20 días y posteriormente, las células fueron recuperando su morfología inicial similar a la de las células control, pero conservando los gránulos citoplasmáticos durante toda la dosis (figura 2.E).

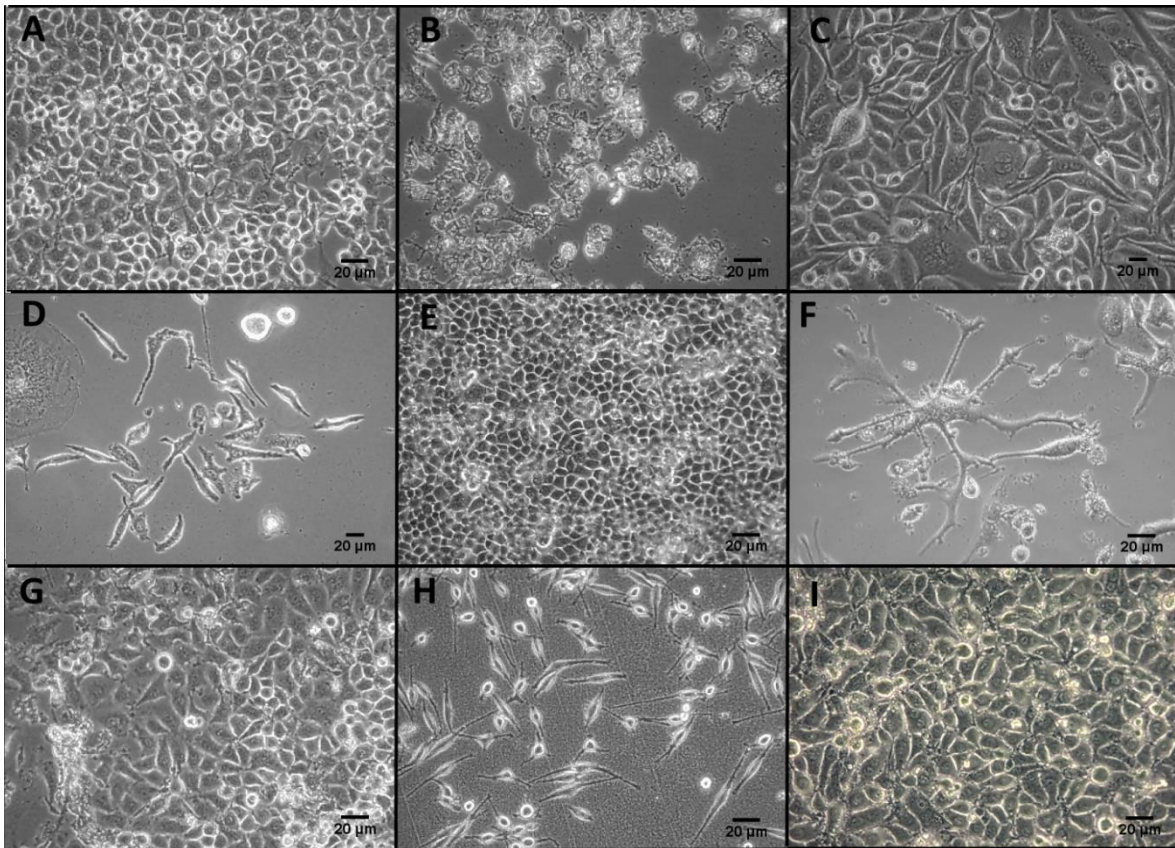


Figura 2. Fotografías de células SiHa expuestas a distintas concentraciones de cisplatino durante el proceso de generación de resistencia. **A.** Células SiHa sin estímulo, **B.** Células SiHa expuestas a CDDP 0.05 µg/ml, **C.** Células SiHa resistentes a CDDP 0.05 µg/ml, **D.** Células SiHa expuestas a CDDP 0.1 µg/ml, **E.** Células SiHa resistentes a CDDP 0.1 µg/ml, **F.** Células SiHa expuestas a 0.5 µg/ml donde los cambios morfológicos son evidentes, **G.** Células SiHa resistentes a 0.5 µg/ml, **H.** Células SiHa expuestas a 1 µg/ml, se evidencian detritos en el medio celular correspondiente a las células muertas debido al quimiofármaco, **I.** Células SiHa resistentes a 1 µg/ml.

Para generar el tercer estadio de resistencia, las células estuvieron expuestas a la dosis de 0.5µg/ml durante un mes, en los primeros ocho días de exposición se observó la muerte del 20% de la población celular y en los siguientes 12 días la población disminuyó hasta alcanzar una confluencia mínima del 30%. En este estadio los cambios morfológicos fueron más evidentes y se observó un aumento en el tamaño celular, el cual puede deberse a que al ser células epiteliales, estas necesitan formar un enmallado con otras células y al disminuir drásticamente la confluencia celular, estas se ven obligadas a aumentar su tamaño para buscar entrar en contacto con la célula más cercana (figura 2.F), sin embargo, las células regresaron a su forma habitual conservando los gránulos en el citoplasma como en las dosis anteriores (figura 2.G). Dichos cambios se pueden evidenciar aún más en la figura 3, donde se comparan las células control con

las células expuestas a 1 $\mu\text{g/ml}$, durante y después de generar resistencia a cisplatino (figura 3 B y C).

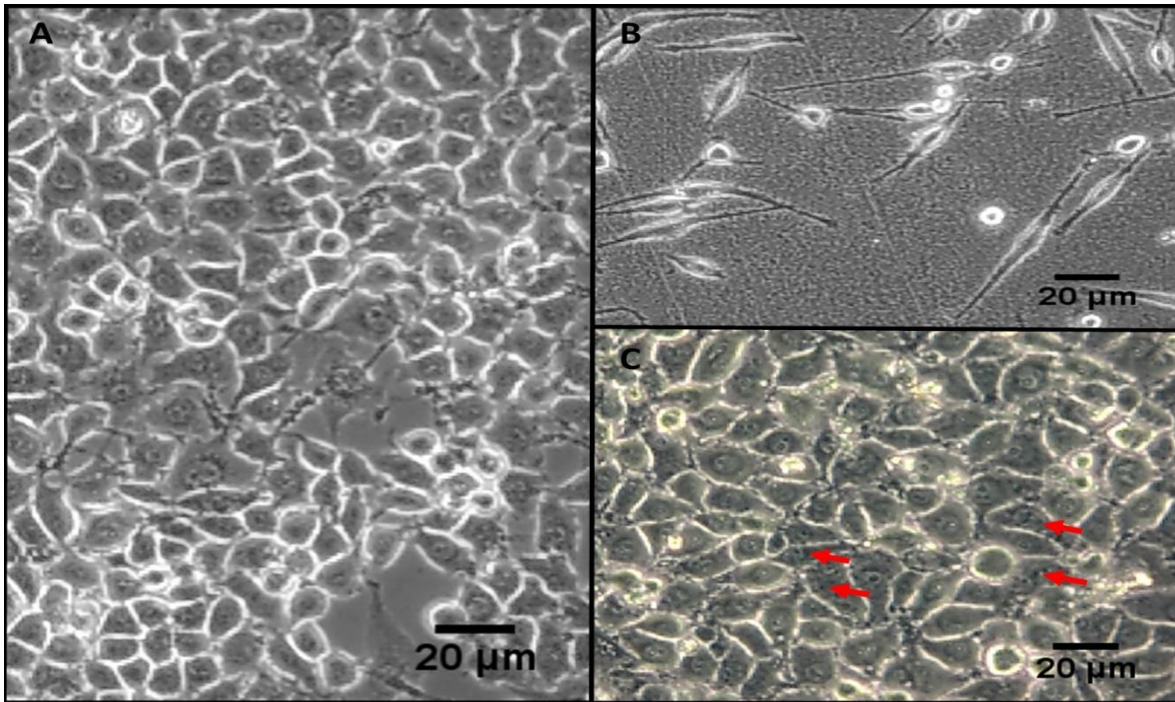


Figura 3. Comparación de células SiHa resistentes a 1 $\mu\text{g/ml}$ de cisplatino con respecto a las células control sin estímulo. **A.** Células SiHa sin estímulo; **B.** Células SiHa expuestas a 1 $\mu\text{g/ml}$ CDDP; **C.** Células SiHa resistentes a 1 $\mu\text{g/ml}$ CDDP, se evidencia la presencia de gránulos en el citoplasma.

Cuando se realizó el análisis de los Dot blot, se encontró que los valores de significancia obtenidos para Kv10.1 (figura 4.A) y p53 (figura 4.B), fueron $p < 0.05$ y $p < 0.001$ respectivamente, lo que evidencia diferencias significativas entre la expresión de las proteínas y el estadio de resistencia a cisplatino. Sin embargo, a pesar del comportamiento variable de Kv10.1 y p53, no se encontró que el incremento de su expresión tuviera una relación proporcional al incremento en la concentración del quimio fármaco. No se encontraron diferencias significativas para la proteína empleada como control de carga dado que la expresión de GAPDH se mantuvo constante durante los diferentes estadios de resistencia a cisplatino ($p=0.5$). Este resultado confirma que la variación observada en la expresión de Kv10.1 y p53 no se debe a una variación en la cantidad de proteína sembrada en cada pozo, sino que dicha variación es el resultado de cambios en la expresión de las proteínas durante la generación de resistencia a cisplatino (figura 4.C).

El comportamiento de las proteínas Kv10.1 y p53 fue variable en los diferentes estadios de resistencia. Se observó que los incrementos drásticos de cisplatino, como el primer estímulo y posteriormente al incrementar cinco veces la dosis (de 0.1 $\mu\text{g/ml}$ a 0.5 $\mu\text{g/ml}$), generaron una disminución significativa en la expresión de ambas proteínas (figura 4 A y 4B); por el contrario,

cambios menores en las dosis del fármaco (al duplicar las dosis) no generaron alteraciones en la expresión de estas proteínas; demostrando que se produce una variación estadísticamente significativa en la expresión de estas proteínas cuando hay un incremento alto en la dosis de cisplatino.

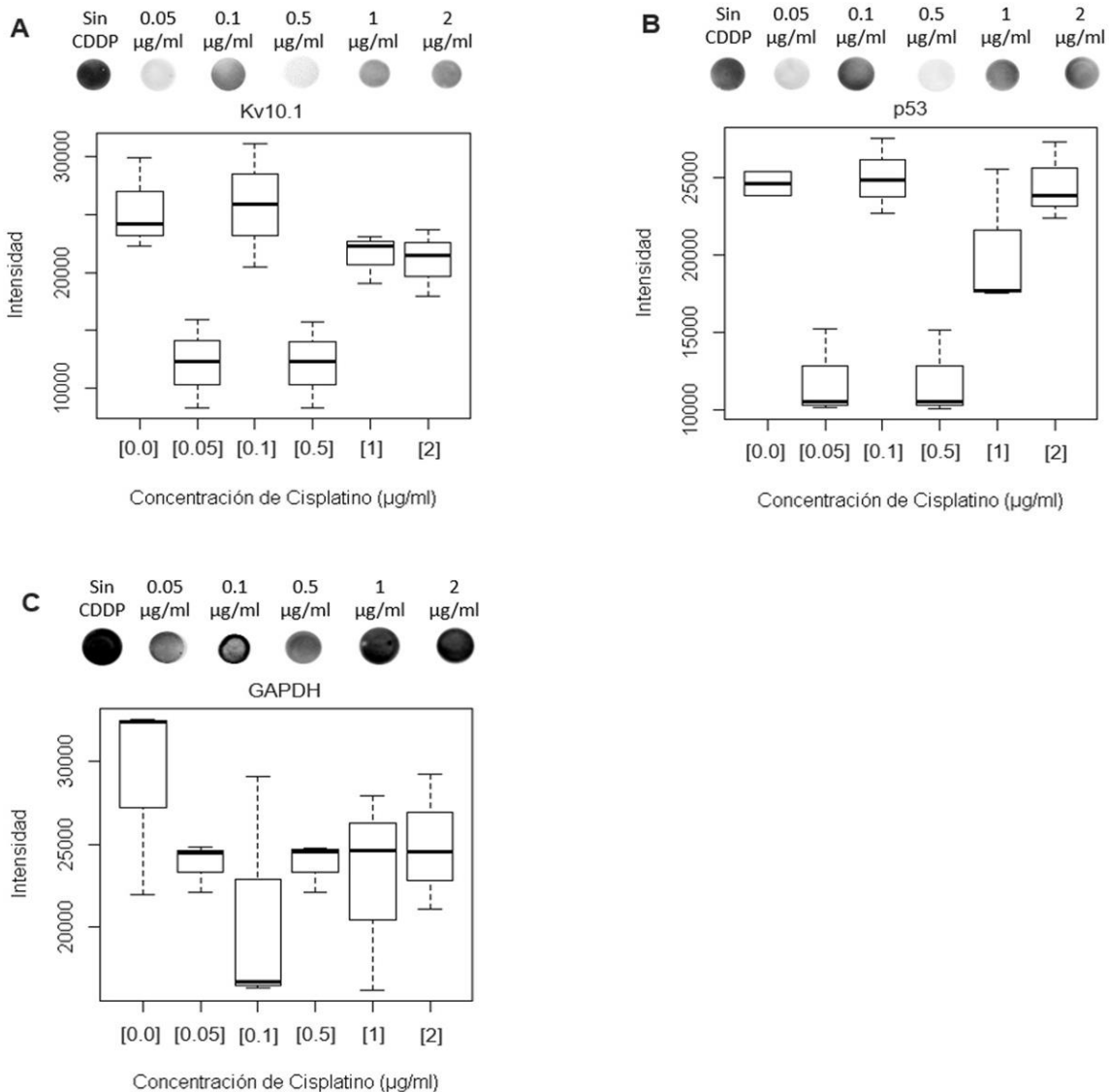


Figura 4. **A.** Intensidad de la expresión de la proteína Kv10.1 en diferentes estadios de resistencia a Cisplatino ($p=0.00162$). **B.** Intensidad de la expresión de la proteína p53 en diferentes estadios de resistencia a Cisplatino ($p=0.000317$). **C.** Intensidad de la expresión de la proteína GAPDH en diferentes estadios de resistencia a Cisplatino ($p=0.5$).

DISCUSIÓN

El principal mecanismo de acción del cisplatino es interactuar con la molécula de ADN formando enlaces cruzados o aductos principalmente con las bases purinas (Siddik, 2003); sin embargo, su capacidad de unirse a diversas proteínas en la célula, genera mecanismos de resistencia complejos que involucran cambios genéticos y epigenéticos, así como variación en la funcionalidad de las proteínas, lo que incluye alteración en las vías de señalización apoptóticas (Köberle, *et al.* 2010; Shen, *et al.* 2012).

Se han descrito cambios morfológicos asociados a la forma, tamaño y apariencia celular en diversas líneas celulares expuestas a cisplatino (Puspita y Bedford, 2017). Los ensayos sobre la línea celular SiHa evidenciaron cambios morfológicos que se mantuvieron a lo largo del proceso de generación de resistencia y daño fisiológico generado como consecuencia de la exposición al quimiofármaco. En comparación con los controles, que mantuvieron la morfología epitelial característica con altas relaciones nucleoplasmáticas y nucleolos conspicuos (Friedl, *et al.* 1970), en las células expuestas a cisplatino se evidenciaron cambios morfológicos con un incremento en la fragilidad. Dichos cambios sugieren que en la exposición a cisplatino las células entraban en procesos de estrés oxidativo. Otros autores (Luo, *et al.* 2018; Sood y Srinivasan, 2015; Wang, *et al.* 2010; Xu, *et al.* 2015) reportan cambios similares en líneas celulares expuestas al mismo quimiofármaco. Adicionalmente, el tamaño, la contracción celular y la formación de burbujas en las membranas nos permiten evidenciar que la apoptosis es el tipo de muerte involucrada en el tratamiento con cisplatino tal como lo reportan Wang y colaboradores (Wang, *et al.* 2010).

Otro cambio que se mantuvo a lo largo del proceso de generación de resistencia fue la aparición de gránulos en el citoplasma de las células. Una vez expuestas a cisplatino dichos gránulos no desaparecieron incluso cuando las células generaron el fenotipo resistente. Se sugiere que estos gránulos pueden aparecer debido a diferentes mecanismos de resistencia al quimio fármaco tales como la reducción intracelular de cisplatino reactivo por medio de la inactivación de proteínas que contienen tiol (Shen, *et al.* 2012) y dado que el cisplatino al ingresar a las células puede unirse a otras dianas terapéuticas, si se une a proteínas que contienen tiol como metionina o metalotioneína, puede agotar las reservas de antioxidantes intracelulares, reduciendo la disponibilidad de cisplatino reactivo (Minervini, *et al.* 2019). Al unirse a estas proteínas el cisplatino no cumple su función de daño al ADN pero tampoco es expulsado de la célula para una desintoxicación y esta inactivación del cisplatino se evidencia en forma de gránulos en el citoplasma celular (Townsend y Tew, 2003). Otra posible explicación para la aparición de gránulos en el citoplasma celular puede ser la generación de estrés en el retículo endoplasmático lo que conlleva a la respuesta de proteínas no plegadas (UPR) por lo que se acumulan proteínas sin plegar tanto en el citoplasma como en el retículo endoplasmático (RE), lo que podría evidenciarse como los gránulos que se observan en el citoplasma del fenotipo resistente.

Gran cantidad de proteínas son plegadas en el lumen del RE para luego ser secretadas y transportadas al organelo donde cumplirá su función (Geoffrey M. Cooper y Hausman, 2008); sin embargo, al ser el RE una de las dianas citoplasmáticas del cisplatino, su función puede verse afectada y en consecuencia se puede presentar un plegamiento de las proteínas, las cuales se retienen en el RE para su posterior degradación y así reestablecer la homeostasis celular o inducir apoptosis (Walter y Ron, 2011). Al generarse una acumulación de proteínas sin plegar en el RE se produce estrés del RE y se activa el mecanismo de UPR, que indica que el estrés del RE no pudo ser mitigado. En este punto, puede ocurrir que gracias a la activación de UPR se reduzca la carga de proteínas en el RE, inactivando temporalmente la síntesis de proteínas y activando programas de transcripción de genes que incrementen el plegamiento de proteínas, o, si no se obtiene la homeostasis celular se induce la apoptosis mediada por el RE. Por otro lado, la activación de UPR puede favorecer el desarrollo de resistencia a cisplatino en las células, al activar mecanismos aun no esclarecidos para protegerla de la apoptosis mediada por RE (Xu *et al.* 2015b). Adicionalmente, Chen y colaboradores (Chen, *et al.* 2011) sugieren que UPR posee una función citoprotectora en las células tratadas con cisplatino, que depende de la autofagia celular, dado que se ha demostrado su activación por el estrés del RE como un mecanismo defensivo para la supervivencia celular (Ogata, *et al.* 2006). Estas proteínas sin plegar o plegadas incorrectamente se acumulan en el lumen del RE y podrían ser expulsadas del RE y precipitarse, o simplemente no degradarse y acumularse para originar los gránulos observados en las células resistentes a cisplatino.

En mamíferos adultos sanos la expresión de Kv10.1 está restringida principalmente a células del sistema nervioso (Cázares-Ordoñez y Pardo, 2017) y hasta la fecha de este trabajo no se han encontrado reportes sobre la expresión de la proteína Kv10.1 en líneas celulares de cuello uterino sanas. Sin embargo, en algunos resultados observados en el presente estudio (datos no mostrados), se pudo corroborar que al obtener una expresión similar de dicho canal de potasio en células cancerígenas de cuello uterino y en tejido de cerebro de ratón, se acepta que las células SiHa presentan de base una alteración en la expresión de Kv10.1 y p53 debido a que ambas proteínas se han descrito como precursores oncogénicos porque su expresión resulta en procesos como la alteración de apoptosis, angiogénesis y control de volumen celular (Ouadid-Ahidouch, *et al.* 2016; Pardo y Stühmer, 2014), sin embargo, el efecto del cisplatino en la expresión de las proteínas Kv10.1 y p53 durante la generación de resistencia en células SiHa de cáncer de cuello uterino aún no se ha descrito, aunque estudios similares con líneas celulares de otro tipo de cáncer ginecológico como lo es el cáncer de ovario se ha observado que no han reportado que exista un aumento en la expresión de la proteína p53, y concluyeron que la citotoxicidad inducida *in vitro* por cisplatino en células de cáncer de ovario es independiente de p53 (Feudis, *et al.* 1997). Adicionalmente, se demostró mediante un estudio con células de cáncer de ovario transfectadas con VPH 16 que al expresarse la proteína E6 por la presencia del virus, esta tiende a degradar o inhibir a p53 (Pardo y Stühmer, 2014; Yazlovitskaya, *et al.* 2001), resultado que concuerda con lo obtenido en este estudio teniendo en cuenta la disminución significativa de la expresión de p53 en los estadios 1 (0.05µg/ml) y 3 (0.5µg/ml) de generación de resistencia, y aunque la relación entre la expresión de p53 y Kv10.1 en líneas celulares cancerígenas sin exposición al fármaco tiende a trabajar en direcciones opuestas, la disminución de la expresión de una incrementa la expresión de la otra (Pardo y Stühmer, 2014), en este

estudio, se observó que la exposición a cisplatino interfiere con el mecanismo de regulación de estas dos proteínas, lo que resulta en comportamientos similares durante la generación de resistencia al quimio fármaco.

Las diferencias significativas encontradas en el comportamiento de las proteínas en los diferentes estadios de resistencia evidencian una disminución en la expresión de ambas proteínas durante la exposición a las concentraciones 0.05 µg/ml y 0.5 µg/ml de cisplatino, siendo este el primer reporte en una línea celular de cáncer de cuello uterino. Inferimos que dichos cambios están asociados con la exposición al fármaco, puesto que se observaron cambios morfológicos previamente descritos en la membrana celular y proponemos que, al exponer las células a una primera dosis de cisplatino, el canal Kv10.1 se ve afectado, disminuyendo su expresión como respuesta rápida, y es posible que se generen uno o más mecanismos de resistencia dando como resultado el fenotipo resistente.

Se sugiere que la célula tiene otros mecanismos de respuesta rápida a pequeñas dosis de cisplatino que genera resistencia sin alterar de manera significativa la expresión de su maquinaria proteica, sin embargo, a dosis altas se evidencia la alteración y la dificultad para recuperarse.

Los mecanismos de regulación celular relacionados con la expresión del canal Kv10.1 en cánceres ginecológicos están relacionados con la modulación de la resistencia a cisplatino como se reportó en muestras de tejido de pacientes con cáncer de ovario tratados con dicho quimiofármaco (Hui, *et al.* 2015); sin embargo, nuestros resultados no evidencian un incremento en la expresión de Kv10.1 asociado al incremento de la resistencia, por lo tanto, se sugiere que la expresión del canal de potasio está relacionada con la expresión de la proteína p53, teniendo en cuenta el comportamiento similar que presentaron ambas proteínas evaluadas. La disminución en la expresión de p53 está de acuerdo con lo reportado por Yazlovitskaya y colaboradores, quienes demostraron que la expresión E6 por la presencia del VPH-16 transfectado en células de cáncer de ovario conducía a la degradación o inhibición de p53 (Yazlovitskaya, *et al.* 2001). Esta degradación podría no tener impacto alguno o tener un impacto negativo en la expresión de Kv10.1.

Adicionalmente la expresión variable de Kv10.1 podría deberse a los tiempos de exposición de las células en cada estadio. Las concentraciones utilizadas fueron tomadas de un estudio realizado por Wen y colaboradores (Wen, *et al.* 2017), sin embargo, los tiempos de exposición de las células a las distintas concentraciones de cisplatino en nuestro estudio fueron menores a los utilizados en su trabajo, debido a que se esperaba alcanzar mínimo un 80% de confluencia para incrementar la concentración de exposición, y dicha confluencia en las primeras dosis se alcanzó en cuestión de semanas y no en los meses referenciados por Wen y colaboradores quienes expusieron las células a cisplatino durante un mes a una concentración de 0.1 µg/ml, 2 meses a 0.5 µg/ml, 3 meses a 1 µg/ml, 2 meses más a 1.5 µg/ml y finalmente mantenidas en 2 µg/ml de cisplatino durante los siguientes 30 pases. Adicionalmente, la primera concentración de cisplatino utilizada en el estudio fue de 0.1 µg/ml y esta no fue tolerada por las células SiHa utilizadas en este trabajo pues la totalidad de células presentó muerte celular en las primeras 24

h de exposición al quimiofármaco (datos no presentados) y por eso las dosis utilizadas en este estudio empezaron desde 0.05 $\mu\text{g/ml}$.

Fuera de los argumentos ya expuestos, se desconoce la razón exacta por la cual no hubo una relación entre el aumento de la resistencia y el incremento de la expresión de la proteína Kv10.1, aunque era lo esperado. Sin embargo, partiendo de los resultados aquí reportados y teniendo en cuenta que no existen reportes similares en células SiHa resistentes a cisplatino, se podría esperar que el incremento del tiempo de exposición al fármaco cisplatino y de las dosis del mismo conduzcan a la generación de resistencia por mecanismos distintos a los aquí observados.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que el mecanismo de respuesta a la exposición de cisplatino en células de cáncer de cuello uterino SiHa difiere de lo reportado para otros tipos de cáncer pues no se evidenció un incremento en la expresión de Kv10.1, en contraste, su expresión fue similar a la observada en la proteína p53. Adicionalmente, contrario a lo reportado en la literatura, Kv10.1 y p53 no presentaron comportamientos antagónicos, por lo que el mecanismo de resistencia que se genera a la exposición a cisplatino es ajeno a la actividad de ambas proteínas, por lo cual estas no son las mejores candidatas para ser utilizadas como biomarcadores para la resistencia a cisplatino en cáncer de cuello uterino. Por otro lado, nuestros resultados corresponden a un primer reporte sobre el comportamiento de las proteínas Kv10.1 y p53 durante la resistencia a cisplatino en cáncer de cuello uterino, lo cual resalta la necesidad de profundizar en temas relacionados con los mecanismos de resistencia a fármacos en células de cáncer para el desarrollo de terapias dirigidas contra blancos específicos que ayuden a mejorar la eficiencia de la quimioterapia en pacientes. Adicionalmente, se sugiere realizar estudios similares con técnicas más sensibles como RT-PCR y utilizar como control células de cuello uterino normales para generar un mayor acercamiento a cómo se estarían comportando las proteínas en este tipo de cáncer.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración de Yenny Yolanda Lozano PhD por sus sugerencias y revisión del texto; Agradecemos también a los doctores Luis Ángel Pardo y Walter Stühmer por el anticuerpo suministrado y a la profesora Josefa Rodríguez por la donación de la línea celular trabajada. Los estudios fueron posibles gracias al apoyo financiero,

entre otras, del departamento de biología y ciencias básicas de la Universidad de La Salle y la Vicerrectoría de Investigación y transferencia (VRIT).

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

REFERENCIAS

Bai L, Zhu W-G. p53: structure, function and therapeutic applications. *J Cancer Mol.* 2006;2(4):141–153. Doi:10.29685/JCM.200608.0002

Cázares-Ordoñez V, Pardo LA. Kv10.1 potassium channel: from the brain to the tumors. *Biochem Cell Biol.* 2017;95(5):531–6. Doi:10.1139/bcb-2017-0062

Chen R, Dai RY, Duan CY, Liu YP, Chen SK, Yan DM, *et al.* Unfolded protein response suppresses cisplatin-induced apoptosis via autophagy regulation in human hepatocellular carcinoma cells. *Folia Biol (Praha).* 2011;57(3):87–95. Doi:21888831

Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* 2014;740(14):364-378. Doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025.

Feudis PD, Debernardis D, Beccaglia P, Valenti M, Siré EG, Arzani D, *et al.* DDP-induced cytotoxicity is not influenced by p53 in nine human ovarian cancer cell lines with different p53 status. *Br J Cancer.* 1997;76(4):474–9. Doi:10.1038/bjc.1997.412

Flores-Miramontes MG, Torres-Reyes LA, Aguilar-Lemarroy A, Vallejo-Ruiz V, Piña-Sánchez P, Cortés-Gutiérrez E, *et al.* [HPV genotypes prevalence in México and worldwide detected by Linear Array]. *Rev Medica Inst Mex Seguro Soc.* 2015;53 Suppl 2:S122-130.

Friedl F, Kimura I, Osato T, Ito Y. Studies on a New Human Cell Line (SiHa) Derived from Carcinoma of Uterus. I. Its Establishment and Morphology. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1970;135(2):543–5. Doi:10.3181/00379727-135-35091a

Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Pérez JM. Cisplatin biochemical mechanism of action: from cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways. *Curr Med Chem.* 2003;10(3):257–66.

Gamboa O, Murillo R. Estimación de la carga económica de las lesiones preneoplásicas y el cáncer de cuello uterino en Colombia. Implicaciones para la vacunación contra el VPH. *Rev Colomb Cancerol.* 2016;20(2):61–72. Doi:10.1016/j.rccan.2016.02.004

Geoffrey M. Cooper, Hausman RE. *La célula.* Sexta edición. Marbán; 2008.

Gómez D, Luis H, García Valdés A, Álvarez Castillo F. Cáncer de cuello uterino. *Rev Cuba Obstet Ginecol.* 2010;36(4):603–12.

Gómez VMM, Martínez JC. Vigilancia y análisis del riesgo en salud pública. Protocolo de vigilancia en salud pública: cáncer de mama y cuello uterino. Instituto Nacional de Salud. 2017;2(03):14.

Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*. 2005;24(17):2899. Doi:10.1038/sj.onc.1208615

zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(5):342–50. Doi:10.1038/nrc798

Hui C, Lan Z, Yue-li L, Li-lin H, Li-lin H. Knockdown of Eag1 Expression by RNA Interference Increases Chemosensitivity to Cisplatin in Ovarian Cancer Cells. *Reprod Sci Thousand Oaks Calif*. 2015;22(12):1618–26. Doi:10.1177/1933719115590665

Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev*. 1999;99(9):2467–98.

Köberle B, Tomicic MT, Usanova S, Kaina B. Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1806(2):172–82. Doi:10.1016/j.bbcan.2010.07.004

Lang F, Busch GL, Ritter M, Völkl H, Waldegger S, Gulbins E, *et al*. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev*. 1998;78(1):247–306. Doi:10.1152/physrev.1998.78.1.247

Leanza L, O'Reilly P, Doyle A, Venturini E, Zoratti M, Szegezdi E, *et al*. Correlation between potassium channel expression and sensitivity to drug-induced cell death in tumor cell lines. *Curr Pharm Des*. 2014;20(2):189–200.

Lin H, Li Z, Chen C, Luo X, Xiao J, Dong D, *et al*. Transcriptional and Post-Transcriptional Mechanisms for Oncogenic Overexpression of Ether A Go-Go K⁺ Channel. *PLOS ONE*. 2011;6(5):e20362. Doi:10.1371/journal.pone.0020362

Luo C, Fan W, Jiang Y, Zhou S, Cheng W. Glucose-Related Protein 78 Expression and Its Effects on Cisplatin-Resistance in Cervical Cancer. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. 2018;24:2197–209. Doi:10.12659/msm.906413

María L, García H, Dueñas González A. Papel de la quimioterapia en el tratamiento del carcinoma cervicouterino. 2018.

Marklund L, Henriksson R, Grankvist K. Cisplatin-induced apoptosis of mesothelioma cells is affected by potassium ion flux modulator amphotericin B and bumetanide. *Int J Cancer*. 2001;93(4):577–83.

Martínez R, Stühmer W, Martin S, Schell J, Reichmann A, Rohde V, *et al*. Analysis of the expression of Kv10.1 potassium channel in patients with brain metastases and glioblastoma multiforme: impact on survival. *BMC Cancer*. 2015;15:839. Doi:10.1186/s12885-015-1848-y

- Minervini T, Cardey B, Foley S, Ramseyer C, Enescu M. Fate of cisplatin and its main hydrolysed forms in the presence of thiolates: a comprehensive computational and experimental study. *Met Integr Biometal Sci*. 2019;11(4):833–44. Doi:10.1039/c8mt00371h
- Napp J, Monje F, Stühmer W, Pardo LA. Glycosylation of Eag1 (Kv10.1) potassium channels: intracellular trafficking and functional consequences. *J Biol Chem*. 2005;280(33):29506–12. Doi:10.1074/jbc.M504228200
- Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, *et al*. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol*. 2006;26(24):9220–31. Doi:10.1128/MCB.01453-06
- Ohya S, Kito H, Hatano N, Muraki K. Recent advances in therapeutic strategies that focus on the regulation of ion channel expression. *Pharmacol Ther*. 2016;160:11–43. Doi:10.1016/j.pharmthera.2016.02.001
- Ouadid-Ahidouch H, Ahidouch A, Pardo LA. Kv10.1 K⁺ channel: from physiology to cancer. *Pflug Arch - Eur J Physiol*. 2016;468(5):751–62. Doi:10.1007/s00424-015-1784-3
- Pardo LA, Contreras-Jurado C, Zientkowska M, Alves F, Stühmer W. Role of voltage-gated potassium channels in cancer. *J Membr Biol*. 2005;205(3):115–24. Doi:10.1007/s00232-005-0776-1
- Pardo LA, Stühmer W. Eag1: An Emerging Oncological Target. *Cancer Res*. 2008;68(6):1611–3. Doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5710
- Pardo LA, Stühmer W. The roles of K⁺ channels in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2014a;14(1):39. Doi:10.1038/nrc3635
- Pardo LA, Stühmer W. The roles of K⁺ channels in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2014b;14(1):39–48. Doi:10.1038/nrc3635
- Penson RT, Huang HQ, Wenzel LB, Monk BJ, Stockman S, Long HJ, *et al*. Bevacizumab for advanced cervical cancer: patient-reported outcomes of a randomised, phase 3 trial (NRG Oncology–Gynecologic Oncology Group protocol 240). *Lancet Oncol*. 2015;16(3):301–11. Doi:10.1016/S1470-2045(15)70004-5
- Perego P, Giarola M, Righetti SC, Supino R, Caserini C, Delia D, *et al*. Association between Cisplatin Resistance and Mutation of p53 Gene and Reduced Bax Expression in Ovarian Carcinoma Cell Systems. *Cancer Res*. 1996;56(3):556–62.
- Perez RP. Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *Eur J Cancer*. 1998;34(10):1535–42. Doi:10.1016/S0959-8049(98)00227-5
- Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends Mol Med*. 2010;16(3):107–21. Doi:10.1016/j.molmed.2010.01.005
- Puspita NA, Bedford A. Morphological Changes of Cisplatin-resistant Human Breast Cancer MCF-7 Cell Line. *Int J Integr Health Sci*. 2017;5(1):8–14.

Rahaman J, Steiner N, Hayes MP, Chuang L, Fishman D, Gretz III H. Chemotherapy for Gynecologic Cancers. *Mt Sinai J Med J Transl Pers Med*. 2009;76(6):577–88. Doi:10.1002/msj.20143

Rakotomahenina H, Bonneau C, Ramanah R, Rouzier R, Brun J-L, Riethmuller D. Epidemiología, prevención y detección precoz del cáncer de cuello uterino. *EMC - Ginecol-Obstet*. 2016;52(3):1–13. Doi:10.1016/S1283-081X(16)79192-2

Roy M, Mukherjee S. Reversal of resistance towards cisplatin by curcumin in cervical cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 2014;15(3):1403–10. Doi:10.7314/apjcp.2014.15.3.1403

Sakamoto M, Kondo A, Kawasaki K, Goto T, Sakamoto H, Miyake K, *et al*. Analysis of gene expression profiles associated with cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines and tissues using cDNA microarray. *Hum Cell*. 2001;14(4):305–15.

Serman F. Cancer cervicouterino: epidemiología, historia natural y rol del virus papiloma humano: perspectivas en prevención y tratamiento. *Rev Chil Obstet Ginecol*. 2002;67(4):318–23. Doi:10.4067/S0717-75262002000400011

Shen D-W, Pouliot LM, Hall MD, Gottesman MM. Cisplatin Resistance: A Cellular Self-Defense Mechanism Resulting from Multiple Epigenetic and Genetic Changes. *Pharmacol Rev*. 2012;64(3):706–21. Doi:10.1124/pr.111.005637

Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*. 2002;2(2):103–12. Doi:10.1016/S1535-6108(02)00102-2

Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 2003;22(47):7265–79. Doi:10.1038/sj.onc.1206933

Small WJ, Bacon M, Bajaj A, Chuang L, Fisher B, Harkenrider M, *et al*. Cáncer cervical: una crisis de salud global. *American Cancer Society*. 2017;123(13):2404–12. Doi:doi.org/10.1002/cncr.30667

Sood S, Srinivasan R. Alterations in gene promoter methylation and transcript expression induced by cisplatin in comparison to 5-Azacytidine in HeLa and SiHa cervical cancer cell lines. *Mol Cell Biochem*. 2015;404(1):181–91. Doi:10.1007/s11010-015-2377-3

Stewart JJ, White JT, Yan X, Collins S, Drescher CW, Urban ND, *et al*. Proteins associated with Cisplatin resistance in ovarian cancer cells identified by quantitative proteomic technology and integrated with mRNA expression levels. *Mol Cell Proteomics MCP*. 2006a;5(3):433–43. Doi:10.1074/mcp.M500140-MCP200

Stewart JJ, White JT, Yan X, Collins S, Drescher CW, Urban ND, *et al*. Proteins associated with Cisplatin resistance in ovarian cancer cells identified by quantitative proteomic technology and integrated with mRNA expression levels. *Mol Cell Proteomics MCP*. 2006b;5(3):433–43. Doi:10.1074/mcp.M500140-MCP200

Stott DI. Immunoblotting, Dot-Blotting, and ELISPOT Assays: Methods and Applications. *J Immunoassay*. 2000;21(2–3):273–96. Doi:10.1080/01971520009349537

Stühmer W. El canal de potasio dependiente de voltaje Kv10.1 y el cáncer. *Rev Acad Colomb Cienc Exactas Físicas Nat*. 2017;41(160):274–80.

Townsend DM, Tew KD. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*. 2003;22(47):7369–75. Doi:10.1038/sj.onc.1206940

Wadhwa S, Wadhwa P, Dinda AK, Gupta NP. Differential expression of potassium ion channels in human renal cell carcinoma. *Int Urol Nephrol*. 2009;41(2):251–7. Doi:10.1007/s11255-008-9459-z

Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*. 2011;334(6059):1081–6. Doi:10.1126/science.1209038

Wang Q, Zheng X, Yang L, Shi F, Gao L, Zhong Y, *et al*. Reactive oxygen species-mediated apoptosis contributes to chemosensitization effect of saikosaponins on cisplatin-induced cytotoxicity in cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res CR*. 2010;29:159. Doi:10.1186/1756-9966-29-159

Wen Q, Liu Y, Lyu H, Xu X, Wu Q, Liu N, *et al*. Long Noncoding RNA GAS5, Which Acts as a Tumor Suppressor via microRNA 21, Regulates Cisplatin Resistance Expression in Cervical Cancer. *Int J Gynecol Cancer Off J Int Gynecol Cancer Soc*. 2017;27(6):1096–108. Doi:10.1097/IGC.0000000000001028

Xu Y, Li D, Zeng L, Wang C, Zhang L, Wang Y, *et al*. Proteasome inhibitor lactacystin enhances cisplatin cytotoxicity by increasing endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis in HeLa cells. *Mol Med Rep*. 2015a;11(1):189–95. Doi:10.3892/mmr.2014.2683

Xu Y, Xu Y, Wang C, Wang C, Su J, Su J, *et al*. Tolerance to endoplasmic reticulum stress mediates cisplatin resistance in human ovarian cancer cells by maintaining endoplasmic reticulum and mitochondrial homeostasis. *Oncol Rep*. 2015b;34(6):3051–60. Doi:10.3892/or.2015.4283

Yazlovitskaya EM, DeHaan RD, Persons DL. Prolonged wild-type p53 protein accumulation and cisplatin resistance. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;283(4):732–7. Doi:10.1006/bbrc.2001.4849

Zhu K, Fukasawa I, Fujinoki M, Furuno M, Inaba F, Yamazaki T, *et al*. Profiling of proteins associated with cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Int J Gynecol Cancer Off J Int Gynecol Cancer Soc*. 2005;15(5):747–54. Doi:10.1111/j.1525-1438.2005.00247.x