

Universidad Nacional Autónoma de México



Facultad de Química

**Determinación de Calreticulina en la
Membrana Citoplásmica de Células Tumorales
de Carcinoma Pulmonar como Marcador de
Apoptosis Inmunogénica**

Que para obtener el título de

Químico Farmacéutico Biólogo

Presenta

Oswaldo Contreras Ruiz



México D. F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Química**



Jurado asignado:

Presidente: Saturnino de León Chapa

Vocal: Dr. José Sullivan López González

Secretario: Dr. Heriberto Prado García

1er Suplente: Sonia Mayra Pérez Tapia

2do Suplente: Mario Adán Moreno Eutimio

Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorio de Cáncer Pulmonar, Unidad de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Dr. Ismael Cosío Villegas.

Asesor

Dr. Heriberto Prado García

Sustentante

Oswaldo Contreras Ruiz



AGRADECIMIENTOS

- A Dios, a la fuerza que creó la vida a la que yo le dedique horas de estudio para entender esto tan maravilloso.
- A mis padres, por apoyarme en todo lo que he necesitado y por todo lo que me han dado.
- Al Dr. Heriberto Prado García, por tener el tiempo y la dedicación de enseñarme, corregirme y guiarme sobre el camino del conocimiento que elegí y por su gran voluntad de enseñar.
- Al Dr. José Sullivan López González, por permitirme entrar a su grupo de trabajo y por esa gran disposición a enseñar y difundir su conocimiento hacia mí.
- A los amigos y conocidos que me encontré a lo largo de la carrera, por que en algún momento necesite de ellos y en la mayoría encontré ayuda.
- A mi tía Laura y mi abuelita Lolita, por cuidarme y procurarme como si fuera uno de sus hijos.
- A mi abuelita Luisita, porque sólo recibo de ella amor.
- A la Universidad Autónoma de México, por que me siento orgulloso de ser universitario, por lo que representa como institución pública y lo que aporta a cada uno de nosotros como universitarios y al país.



DEDICATORIAS

- A Jessica Ruiz Vivar, porque eres un ejemplo a hacer las cosas bien e inspiración a superarme, por tu apoyo incondicional, por cuidarme y amarme, por todo esto dedico esta tesis y mi agradecimiento eterno, te amo.
- A mis padres, por ser ejemplos de éxito profesional y humano, por sentirse orgullosos de mí aún cuando no le he dado nada.
- A mi hermana Malinalli, por también apoyarme y estar orgullosa de mí simplemente por que elegimos distintos caminos que nos han llevado a la convivencia y respeto.
- A mis amigos, Gersan, Jean Carlo, Rodrigo, Alejandro, Víctor y Mauricio por esa amistad entrañable que tenemos, por ser un grupo donde el apoyo a superarnos hace que cada día uno crezca como persona y profesionalmente.
- A Iván y Diego, que merecen una mención especial por ser aquellos con los que crecí y viví todo lo que ahora me hace ser quien soy.



ÍNDICE

ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN	8
Cáncer pulmonar	8
Clasificación Histológica del cáncer pulmonar	10
Tratamiento del cáncer pulmonar	12
• Cisplatino	
Apoptosis	14
Proceso bioquímico para la inducción de apoptosis	15
• Vía de la mitocondria	16
• Vía del receptor	21
• Vía por p53	23
Apoptosis inmunogénica	24
La Calreticulina	25
ANTECEDENTES	27
El papel de la Calreticulina en la apoptosis inmunogénica	27
Factores moleculares involucrados en la externalización de CRT durante la apoptosis inmunogénica	28
JUSTIFICACIÓN	31
HIPÓTESIS	32
OBJETIVOS	32
MATERIALES Y MÉTODOS	33
Líneas celulares y Reactivos	33
Inducción de apoptosis por campotecina, anticuerpo agonista Anti-Fas y exposición a luz UV	35
Inducción de apoptosis por cisplatino	35
Determinación del porcentaje de células en apoptosis	36
Determinación del porcentaje de células que externalizan CRT a la membrana celular	38
Marcaje de las células tumorales A-427 con PKH26 para el ensayo de fagocitosis	39
Determinación del porcentaje de células tumorales fagocitadas por los macrófagos THP1	40
Análisis estadístico	42
RESULTADOS	43
Apoptosis en la línea A-427 inducida por campotecina, luz UV y anticuerpo agonista anti-Fas	43
Detección de Calreticulina en la membrana citoplásmica de las células	

A-427	45
Determinación del porcentaje de fagocitosis de células tumorales por los macrófagos THP1	48
Inducción de apoptosis en líneas de carcinoma pulmonar con cisplatino	50
Detección de CRT en la membrana citoplásmica de las líneas de carcinoma pulmonar	52
Determinación del porcentaje de fagocitosis de las células A-427 tratadas con cisplatino	53
Correlación entre el porcentaje de células en apoptosis temprana y el porcentaje de células fagocitadas	54
DISCUSIÓN	56
Efecto del cisplatino en la translocación de la CRT a la membrana celular y en la fagocitosis en líneas de carcinoma pulmonar	59
CONCLUSIONES	61
REFERENCIAS	62



INTRODUCCIÓN

Cáncer pulmonar

El cáncer pulmonar es la principal causa de muerte relacionada a neoplasias a nivel mundial. Tan solo en México, en el periodo comprendido de 1998-2004, se registraron un total de 400 000 decesos por cáncer y el 11.5% correspondieron a cáncer pulmonar, de tal forma que se le ha considerado un problema de salud pública.

Se ha descrito que el 87-90% de todos los casos de cáncer pulmonar son detectados en individuos que son fumadores activos o ex fumadores; 6-7% son atribuidos a la exposición a radón o asbestos y un 3% corresponden a la exposición a otros factores ambientales, como la exposición a gases de combustión (Spiro *et al.* 2009).

A pesar de los efectos en la salud y las campañas mundiales en contra del hábito tabáquico se estima que una sexta parte de la población mundial continúa fumando (Martin *et al.* 2009). El riesgo de desarrollar cáncer pulmonar, incluso en aquellas personas consideradas fumadores pesados, es variable; esto está sustentado en el hecho de que solo el 15% de los fumadores pesados desarrollan cáncer pulmonar. Los factores genéticos, epigenéticos y ambientales determinan el riesgo que tiene un individuo a desarrollar la patología; además, el riesgo individual está influenciado por factores como el tiempo que se ha fumado a lo largo de la vida, la edad a la cual se empezó a fumar y el número de cigarrillos que se consumen al día (Spiro *et al.* 2009).

El daño producido al tejido pulmonar debido al hábito tabáquico incluye: la generación de estrés oxidativo que conduce a la muerte celular, daño a nivel genético como la pérdida de la heterocigocidad, mutaciones y la formación de aductos; o bien, daños epigenéticos como la hipermetilación del DNA. Este daño al tejido persiste de forma crónica y eventualmente conlleva a la disfunción celular como la desregulación del ciclo celular y de la apoptosis promoviendo así la proliferación celular. El eventual daño crónico al tejido favorece el desarrollo de lesiones premalignas, como displasia o anaplasia, hasta el desarrollo de neoplasias malignas (Herbst *et al.* 2009, Spiro *et al.* 2009).

Las mutaciones asociadas al cáncer pulmonar incluyen genes como *TP53*, *Ras*, *Erb2* y *Myc*. p53 es esencial para inducir la respuesta de la célula ante el daño del DNA, provocando el arresto del ciclo celular para la reparación del DNA o la inducción de apoptosis. Las proteínas codificadas por la familia de genes Ras son GTPasas



implicadas en la transmisión de señales celulares como: factores externos de crecimiento, apoptosis, adhesión celular y proliferación; mientras que los genes de la familia *Myc* son proteínas nucleares encargadas de la regulación del ciclo celular (Spiro *et al.* 2009).

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) es una oncoproteína que se encuentra sobreexpresada en la mayoría de los tumores pulmonares, codificada por la familia de genes *Erb2*. Estas proteínas son receptores de membrana los cuales al interactuar con sus ligandos, como TFG α (Transforming Growth Factor) o EGR (Epidermal Growth Factor), inducen señales que promueven la proliferación celular. En cáncer pulmonar, EGFR está implicado en procesos del desarrollo tumoral como la evasión a la apoptosis, angiogénesis y metástasis. Es tal su importancia que recientemente se han desarrollado fármacos inhibidores de estos receptores que empiezan a formar parte del tratamiento contra el cáncer pulmonar (Spiro *et al.* 2009 y Herbst *et al.* 2009).

Se ha estimado que la supervivencia a 5 años en pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón es de un 15%, contrastando con otros tipos comunes de cáncer como próstata, mama y colon, la cual es de 99, 88 y 64%, respectivamente.

Existen varias explicaciones por las cuales la supervivencia en el cáncer pulmonar es muy baja, por ejemplo: en el cáncer pulmonar los procedimientos para la detección temprana del tumor son falibles, invasivos e inespecíficos; además, se ha identificado que los síntomas desarrollados por el padecimiento son relacionados a etapas tardías del desarrollo tumoral, por lo que la clínica suele ser de poca ayuda, y los tratamientos y terapias suelen ser poco específicas y poco efectivas (Borczuk *et al.* 2009).



Clasificación histológica del cáncer pulmonar

La Organización Mundial de la Salud (OMS) junto con Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer Pulmonar (IASLC) establecieron la clasificación histológica internacional de los tumores pulmonares, el cual consiste en 4 principales tipos histológicos: el carcinoma de células escamosas, el adenocarcinoma, el carcinoma de células grandes y el carcinoma de células pequeñas (SCLC por sus siglas en inglés). Los tres primeros tipos histológicos agrupados en un solo grupo denominado carcinoma de células no pequeñas (NSCLC) (Spiro *et al.* 2009).

- Carcinoma de células pequeñas.

El carcinoma de células pequeñas (SCLC) está relacionado fuertemente con el hábito tabáquico, representa aproximadamente el 15% de todos los casos de cáncer pulmonar en países como EUA y en la UE, clínicamente se caracteriza por ser un tumor agresivo, con frecuente metástasis y baja respuesta a la quimioterapia. Este tipo histológico es de origen epitelial y consiste en células pequeñas no mayor al tamaño de tres linfocitos, de forma fusiforme, de escaso citoplasma, con bordes celulares irregulares, la cromatina en forma de finos gránulos y carece de nucleolos. Se localiza inicialmente en tejido bronquial con infiltraciones hasta la submucosa bronquial, de tal forma que provoca la subsecuente obstrucción bronquial. Es común observar extensa metástasis particularmente a los ganglios linfáticos y también grandes áreas de necrosis.

El diagnóstico del SCLC se basa en la observación al microscopio de la características morfológicas del tumor y la determinación de algunos biomarcadores inmunohistoquímicos (Spiro *et al.* 2009 y The Cancer Council Victoria 2007).

- Carcinoma de células escamosas.

Este tipo histológico representa, en países de primer mundo como EUA y en la UE, alrededor del 30 al 45% de todos los casos de cáncer pulmonar. El tumor se desarrolla en el árbol bronquial, morfológicamente se caracteriza por la presencia de puentes intercelulares y queratinización, favoreciendo la formación de perlas de citoqueratina en el tejido epitelial. En un porcentaje alto todavía no definido



desarrollan una lesión invasiva característica denominada displasia escamosa, relacionada a un mal pronóstico.

El diagnóstico del carcinoma de células escamosas es mediante observación microscópica de cortes histológicos, ya que se observan signos de diferenciación escamosa particulares al tipo histológico (Spiro *et al.* 2009).

- Adenocarcinoma

Este tipo histológico representa del 50–60% de todos los casos de cáncer pulmonar tanto en Europa como en EU y es el padecimiento más común en personas no fumadoras.

Los adenocarcinomas usualmente se presentan en la periferia del pulmón, derivan del epitelio glandular diferenciado por lo que la producción de moco suele ser característica; la estructura glandular puede ser hacinar, papilar, broncoalveolar o con patrones sólidos con crecimiento mucínicos intracelulares o bien un mezcla de éstos. El diagnóstico de este tipo histológico es mediante biomarcadores inmunohistoquímicos como son algunas citoqueratinas (Spiro *et al.* 2009).

- Carcinoma de células grandes

Este tipo histológico es el menos frecuente, con aproximadamente el 10% de los casos totales de carcinoma pulmonar. Este tumor no muestra patrón morfológico de diferenciación alguno y generalmente su localización es en la periferia pulmonar, aunque también puede localizarse en la región central pulmonar. Histológicamente comprende células de gran tamaño poligonales formando nidos o placas caracterizadas por un núcleo grande vesicular y un nucleolo prominente.

El diagnóstico de este subtipo histológico básicamente es por exclusión, aunque la determinación de marcadores inmunohistoquímicos como algunas citoqueratinas ayudan al diagnóstico final (Spiro *et al.* 2009).



Tratamiento del cáncer pulmonar

Los tratamientos más empleados en contra del cáncer pulmonar son: la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia (Spiro *et al.* 2009).

La cirugía es el tratamiento de elección si el tumor está localizado, es decir, si no se ha extendido a otros tejidos u órganos, relacionado a estadios tempranos del desarrollo tumoral. En la cirugía se remueve una parte específica del pulmón (lobectomía) o bien se puede remover el pulmón entero (neumonectomía) y normalmente es apoyada con radioterapia o quimioterapia adyuvante (The Cancer Council Victoria 2007).

La radioterapia y la quimioterapia son utilizados en tumores no operables, en estadios avanzados del desarrollo tumoral o en los tipos histológicos que suelen ser agresivos e invasivos como el carcinoma de células pequeñas. La quimioterapia y la radioterapia previenen el crecimiento tumoral mediante el arresto del ciclo celular o bien mediante su efecto citotóxico, induciendo directamente la muerte de las células tumorales (The Cancer Council Victoria 2007 y Tesniere *et al.* 2009).

- Cisplatino

El cis-diaminodicloroplatino o cisplatino es uno de los medicamentos antitumorales más potentes y actualmente es de los principales tratamientos quimioterapéuticos en contra del NSCLC (Wang *et al.* 2004 y Spiro *et al.* 2009).

El cisplatino es capaz de atravesar la membrana celular debido a que es una molécula altamente lipofílica o también mediante sistemas transportadores, aún no caracterizados, que promueven el flujo de la molécula al interior de la célula. Una vez en su interior, la molécula se hidroliza formando un complejo altamente reactivo capaz de reaccionar inespecíficamente con sitios nucleofílicos de diferentes moléculas intracelulares como DNA, RNA, proteínas, fosfolípidos, filamentos del citoesqueleto etc., o bien puede ser neutralizada mediante sistemas detoxificantes como glutatión o metaloproteínas (Wang *et al.* 2004).

El efecto citotóxico por el cual el cisplatino elimina a las células tumorales es mediante: i) generación de aductos en el DNA, ii) incremento del estrés oxidativo y iii) inhibición de la división celular (Panaretakis *et al.* 2009, Wang *et al.* 2004 y González *et al.* 2001).

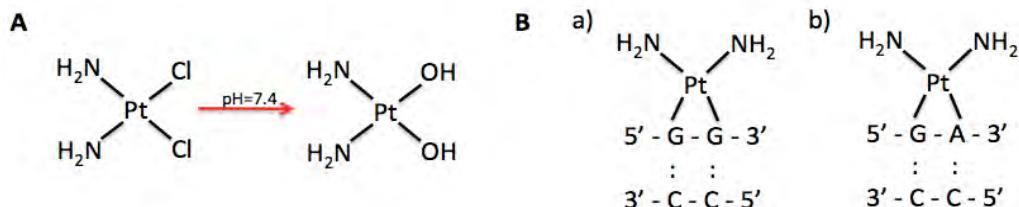


Figura 1. (A) Estructura molecular y reacción de hidrólisis del cisplatino, el compuesto generado es altamente reactivo capaz de reaccionar con cualquier sitio nucleofílico en otras moléculas. (B) Se indican los aductos más comunes generados por el cisplatino al reaccionar con el DNA, los que inhiben la síntesis del DNA así como la transcripción de genes que conlleva a la muerte celular (Figura tomada de ref. Reed 2006).

El daño generado por el cisplatino puede desencadenar distintos tipos de muerte celular, como son: 1) catástrofe mitótica, al inhibir la polimerización de los filamentos de actina durante la mitosis, 2) necrosis, al favorecer la generación de estrés oxidativo y 3) apoptosis, debida a la generación de aductos en el DNA. El tipo de muerte por el cual la célula tumoral sucumbe depende de la concentración de cisplatino a la que son expuestas las células tumorales, la fase del ciclo celular en que se encuentren éstas y la estirpe celular (González *et al.* 2001).



Apoptosis

La apoptosis es el proceso fisiológico en el cual la célula sistemáticamente inactiva, desensambla y degrada su propia estructura y componentes funcionales para inducir su propia muerte. Este proceso es altamente conservado, regulado, genéticamente controlado y es dependiente de energía (Webb *et al.* 1997). La apoptosis está caracterizada y definida por lo cambios bioquímicos y morfológicos en la célula, los cuales son: la pérdida del contacto con la matriz celular (anoikis), contracción o encogimiento celular, la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear y la formación de los cuerpos apoptóticos, evitando que la membrana celular se rompa y se vacíe al exterior el contenido intracelular; sin embargo, se externalizan residuos de fosfatidilserina en dicha membrana. A nivel nuclear se ha observado que ocurre la fragmentación del DNA a oligonucleotidos, fenómeno que no suele observarse en todas las estirpes celulares (Kroemer *et al.* 2009 y Hotchkiss *et al.* 2009).

La apoptosis es un proceso natural en el desarrollo y en el mantenimiento de los organismos multicelulares, juega un papel importante durante la embriogénesis y metamorfosis, el balance entre la apoptosis y la proliferación celular es responsable de moldear tejidos y del desarrollo de órganos en los embriones. Este proceso de muerte también es responsable de mantener la homeostasis celular y corporal; sin la apoptosis, dos toneladas de médula ósea y ganglios linfáticos y 16 Km de intestino se acumularían en el cuerpo humano a la edad de 80 años. También tiene un papel defensivo importante, ya que el proceso favorece la eliminación y la remoción de células infectadas, mutadas o dañadas (Vermelen *et al.* 2005, Dash 2005 y Hotchkiss *et al.* 2009).

La desregulación de la apoptosis está implicada en un gran número de enfermedades. Existen padecimientos donde existe una supresión de la apoptosis o una tolerancia a los estímulos inductores de apoptosis como en el cáncer o bien padecimientos en donde hay una gran sensibilidad a morir por apoptosis, como en el Alzheimer, Parkinson o en la infección por VIH. (Vermelen *et al.* 2005, Elmore 2007 y Dash 2005).



- Proceso bioquímico para la inducción de apoptosis

El proceso de muerte por apoptosis consta de tres etapas: la primera fase es la iniciación, en la cual la célula recibe un estímulo inductor de muerte; en la segunda fase, de ejecución, se dan la mayor parte de los cambios bioquímicos y morfológicos característicos de la apoptosis y finalmente, la fase de eliminación, donde los cuerpos apoptóticos y restos celulares son retirados o eliminados por macrófagos tisulares o células adyacentes (Webb *et al.* 1997).

Se han reconocido varias vías principales de inducción de apoptosis las cuales son: la vía intrínseca o de la mitocondria, la vía extrínseca o del receptor y recientemente se ha propuesto la vía por p53; todas estas vías desencadenan la activación de una familia de proteasas llamadas caspasas (Elmore 2007, Vermelen *et al.* 2005 y Brown *et al.* 2005).

Las caspasas son un grupo de cistein proteasas, las cuales son sintetizadas como proenzimas o zimógenos en todas las células. Se han identificado alrededor de una docena de estas proteasas las cuales se dividen en tres grupos, las caspasas iniciadoras (caspasas 2, 9, 8 y 10), las caspasas efectoras (caspasas 3, 6, y 7) y las caspasas inflamatorias (caspasas 1, 4, y 5). Todas las procaspasas contienen 3 prodominios, denominados prodominio N-terminal, prodominio mayor o p20 y prodominio menor o p10. Las caspasas iniciadoras se caracterizan por tener prodominios N-terminal de gran tamaño. Los prodominios N-terminal de las caspasas iniciadoras 2 y 9 contiene un dominio reclutador de caspasa (Caspase Recruitment Domain, CARD) mientras que las caspasas iniciadoras 8 y 10 contienen dominios efectores de muerte (Death Effector Domain, DED). Estos dominios, en el prodominio N-terminal de las caspasas iniciadoras, sirven de plataforma para su reclutamiento y activación en complejos proteínicos adaptadores (ver figura 2).

Las caspasas se caracterizan por poseer una cisteína en su sitio activo, el cual es capaz de romper el enlace peptídico entre residuos de ácido aspártico y cualquier otro aminoácido. La especificidad por cada sustrato está determinada por los 4 residuos de aminoácidos posterior al sitio de corte en dirección al amino terminal.

Las caspasas son capaces de escindir componentes que son requeridos para el funcionamiento vital de la célula como proteínas del citoesqueleto (lamininas o filamentos de actina), proteínas reparadoras de DNA como Poli-(ADP-ribosa)-

polimerasa, proteínas reguladoras del ciclo celular como pRb o cinasas dependientes de ciclinas, factores de transcripción como el NF- κ B o son capaces de activar DNAsas como la Caspase Activated DNase (CAD) que durante la apoptosis se transloca al núcleo provocando la escisión del DNA. Las caspasas son responsables de la fase de ejecución de la apoptosis y por tanto las responsables de los cambios bioquímicos y morfológicos en las células durante la apoptosis. (Duprez *et al.* 2009, Fink *et al.* 2005, Kroemer *et al.* 2005, Kumar 2007, Timmer *et al.* 2007).



Figura 2. Estructura general de las caspasas, se observan los tres prodominios: el prodominio N-terminal, el prodominio mayor o p20 y el prodominio menor o p10. Las caspasas deben ser activadas para poder ser efectoras, esto es mediante la escisión del prodominio N terminal. (Figura tomada de Ref. Cohen 1997 y Kumar 2007)

- Vía de la mitocondria

La vía intrínseca o de la mitocondria está controlada por las proteínas de la familia de BCL-2. El balance entre estas moléculas y su actividad controlan la permeabilización de la membrana mitocondrial (Mitocondrial Outer Membrane Permeabilization, MOMP). Durante la permeabilización de la membrana mitocondrial se favorece la salida de factores apoptóticos del espacio intermembranal mitocondrial hacia el citoplasma como: el citocromo C, el SMAC/DIABLO (Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/Direct IAP-Bing Protein with Low PI), la End G (Endonuclease G), etc. Estos factores pueden interactuar con moléculas adaptadoras citosólicas para inducir la activación de las caspasas y llevar a cabo la fase de ejecución de la apoptosis, o bien,



tienen una actividad efectora que contribuye al mecanismo de muerte (Chipuk *et al.* 2008, Häcker *et al.* 2007).

Las proteínas de la familia de BCL-2 son clasificadas en tres grupos basados en la presencia de los cuatro dominios homólogos que comparten (BCL-2 homology domains, BH1-4 domains). Las proteínas antiapoptóticas de BCL-2 comparten los dominios BH1-4 generalmente se encuentran en la membrana externa de la mitocondria, aunque también se han encontrado en la membrana nuclear y retículo endoplásmica. Las proteínas proapoptóticas de BCL-2 se clasifican en dos clases, las moléculas efectoras, como BAK (BCL-2 Antagonist Killer 1) y BAX (BCL-2 Associated X Protein), que constitutivamente residen en la membrana mitocondrial y en el citosol, respectivamente. Estas moléculas comparten los dominios BH1-3 y son capaces de provocar la permeabilización de la membrana mitocondrial *post*-activación creando un poro proteolipídico responsable de la liberación de los factores apoptóticos. La otra clase de proteínas proapoptóticas únicamente comparten el dominio BH3, y son llamadas proteínas de dominio único BH3 (BH3 only proteins) como BAD (BCL-2 Antagonist of Cell Death), BIK (BCL-2 Interacting Killer), BIM (BCL-2 Interacting Mediator of Death), PUMA (p53-pregulated Modulator of Death), BID (BCL-2 Interacting Mediator of Cell Death), etc. Estas proteínas funcionan como censores de daño celular como estrés oxidativo, radiación, carencia de factores de crecimiento, daño al DNA, infecciones intracelulares, etc. El estrés celular promueve la activación de las proteínas de dominio único BH3 provocando cambios conformacionales en su estructura, haciéndolas capaces de interactuar mediante su dominio BH3 con las moléculas antiapoptóticas que por consecuencia tiene la neutralización de éstas o bien la activación directa a BAX y BAK (Chipuk *et al.* 2008, Van Delft *et al.* 2006).

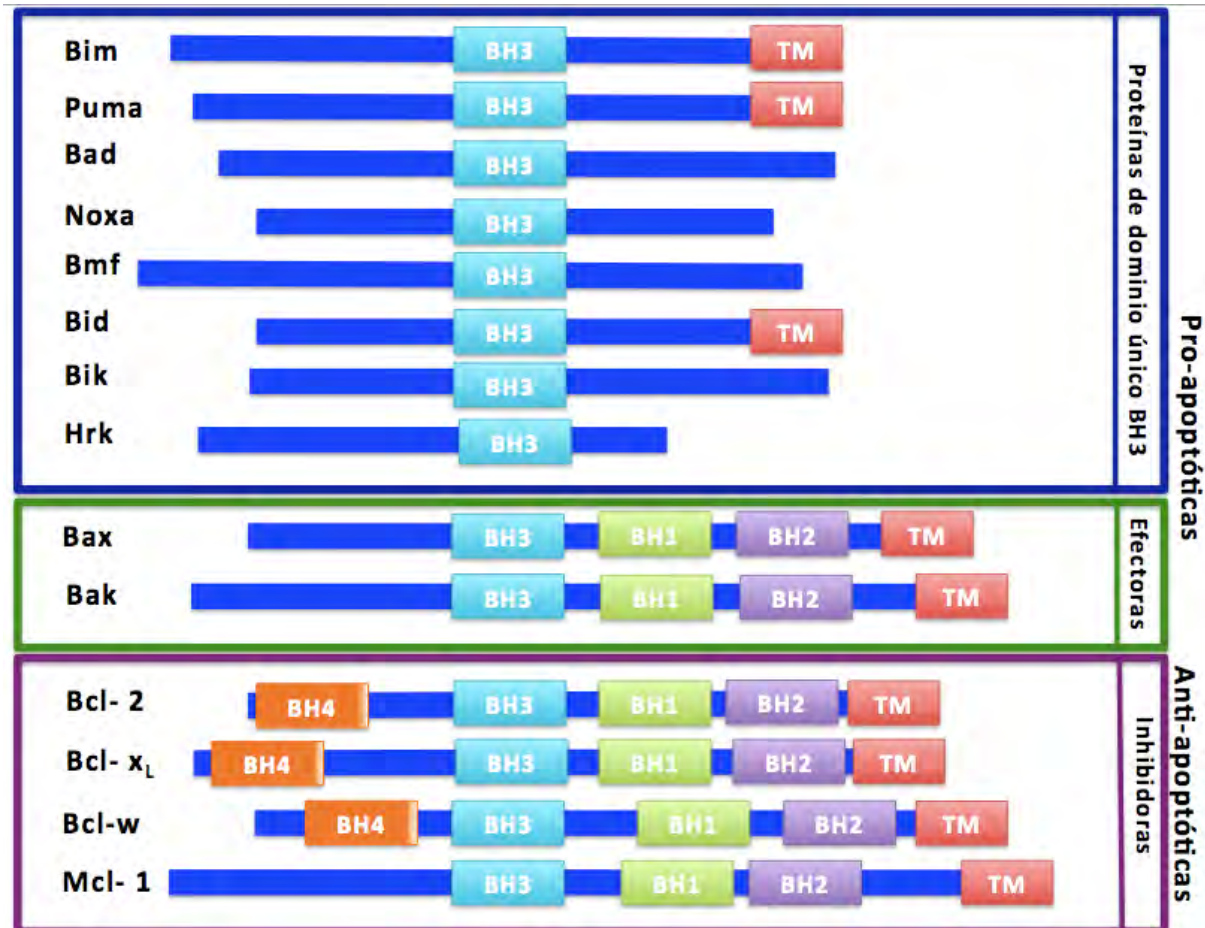


Figura 3. Estructura y función de la familia de proteínas de BCL-2. Las proteínas proapoptóticas de dominio único BH3 se pueden subdividir en activadores directos como BIM, BID o PUMA y los sensores como BAD, BIK, BMF, NOXA. Las proteínas proapoptóticas efectoras como BAK y BAX directamente crean el poro proteolipídico el cual permeabiliza la membrana mitocondrial. El balance entre las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas determinan si la célula induce su muerte (Figura tomada de ref. Chipuk *et al.* 2008 y Häcker *et al.* 2007).

Existen dos modelos que explican cómo la interacción en las proteínas de la familia de BCL-2 provocan la permeabilización de la membrana mitocondrial. Los modelos son: el modelo de neutralización de las proteínas antiapoptóticas y el modelo de la activación directa de BAX y BAK, estos modelos no son mutuamente excluyentes.

El primero propone que las células expresan todas las clases de proteínas de BCL-2; de tal forma, que las proteínas antiapoptóticas deben de inhibir continuamente la



función de BAK y BAX. La señal, en la cual se induce la permeabilización de la membrana mitocondrial, es en el momento en que al censar daño celular las proteínas antiapoptóticas son funcionalmente neutralizadas por las proteínas proapoptóticas de dominio único BH3; de esta forma indirectamente se promueve la liberación de BAX y BAK de sus inhibidores antiapoptóticos, para su hetero-oligomerización en la membrana mitocondrial y formar los poros proteolipídicos responsables de la salida de los factores apoptóticos (Chipuk *et al.* 2008, Häcker *et al.* 2007).

El modelo de la activación directa de BAX y BAK propone que durante la apoptosis sufren un cambio conformacional mediante la interacción con proteínas de dominio único BH3 como BIM, BID y PUMA. Estas moléculas se activan al censar daño celular y funcionan como activadoras directas de BAK y BAX. Los cambios conformacionales en BAX y BAK provocan su translocación a la mitocondria (en el caso de BAX) y la oligomerización en la membrana mitocondrial alterando la permeabilidad de la mitocondria (Chipuk *et al.* 2008, Häcker *et al.* 2007).

Una vez permeabilizada la membrana mitocondrial son liberados los factores apoptóticos (citocromo C, SMAC/DIABLO, End G, etc.) al citosol. El citocromo C interactúa con APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1) que junto con ATP forma un complejo multiproteico llamada apoptosoma, el cual expone un dominio CARD que es capaz de reclutar a la procaspasa 9 e interactuar con el otro dominio CARD de la misma caspasa 9 favoreciendo su activación. Siendo efectora la caspasa 9, activa a las caspasa ejecutoras para llevar a cabo la fase de ejecución de la apoptosis. La endonucleasa G al ser liberada, se transloca al núcleo donde escinde al DNA a oligonucleótidos, mientras que el SMAC/DIABLO inhibe a los IAP's (Inhibitors of Apoptosis), los cuales directa e indirectamente inhiben la actividad de las caspasas (Van Loo *et al.* 2002).

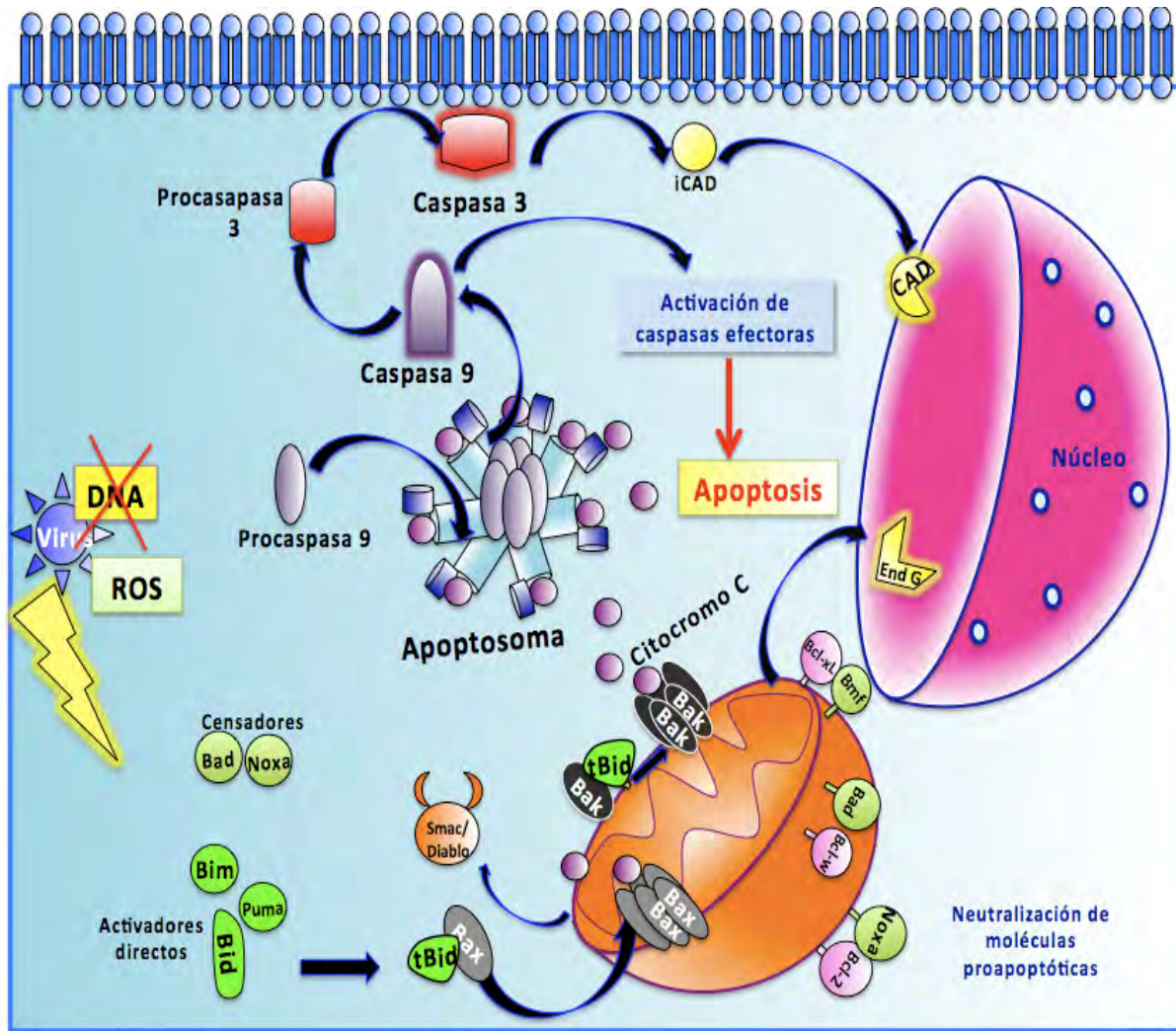


Figura 4. Inducción de apoptosis mediado por la mitocondria. Las moléculas de dominio único BH3 algunas de ellas como BAD, BIK, BIM, etc., al censar estrés celular, como infecciones intracelulares, daño al DNA, estrés oxidativo etc., neutralizan a los proteínas proapoptóticas de la familia de BCL-2 liberando a BAX y BAK de sus represores, o bien el estrés celular directamente activa a BAK y BAX mediante la interacción con activadores directos como BID, BIM o PUMA que sufren cambios estructurales, debido al estrés celular, propiciando la activación de estos. Una vez permeabilizada la membrana mitocondrial se favorece la activación de caspasas, siendo este el punto de no regreso para completar la muerte celular (Häcker *et al.*2007).



- Vía del receptor

La vía extrínseca se activa cuando las moléculas de la superfamilia del TNF interactúan con su receptor en la membrana celular. Estos receptores de muerte, miembros de la familia de receptores del TNF incluyen TNF-R1, Fas o CD95, TRAMP o Apo-3, TRAIL-1 y TRAIL-2. Al interactuar cada ligando con su receptor, éste se trimeriza favoreciendo el reclutamiento de proteínas adaptadoras específicas, como FADD (Fas-Associated Death Domain), a los dominios de muerte en la región citoplasmática del receptor, induciendo así la formación de un complejo multiproteico intracelular llamado DISC (Death Inducing Signaling Complex). A este complejo multiproteico se asocia posteriormente la procaspasa 8 ó 10, mediante sus dominios efectores de muerte (Death Effector Domain, DED) e interactúa con el DISC para autocatalizarse y activarse. Una vez activada la caspasa 8 ó 10, la fase de ejecución es desencadenada. Para los otros receptores de muerte la activación de las caspasas ocurre de forma similar (Vermeulen *et al.* 2008, Hengartner 2000, Gupta 2001).

La vía extrínseca aumenta el umbral de señalización de muerte al activar la vía de la mitocondria (Cross-talk). Al inducirse la activación de la caspasa 8, esta escinde a BID para dar lugar a una forma análoga activa de BID llamada tBID (truncated BID). tBID interactúa con BAX que se encuentra en el citosol induciendo su activación y translocación a la membrana mitocondrial o también tBID puede directamente translocarse a la membrana mitocondrial provocando la oligomerización de BAK y así la permeabilización de la membrana mitocondrial (Ott *et al.* 2009, Hengartner 2000).

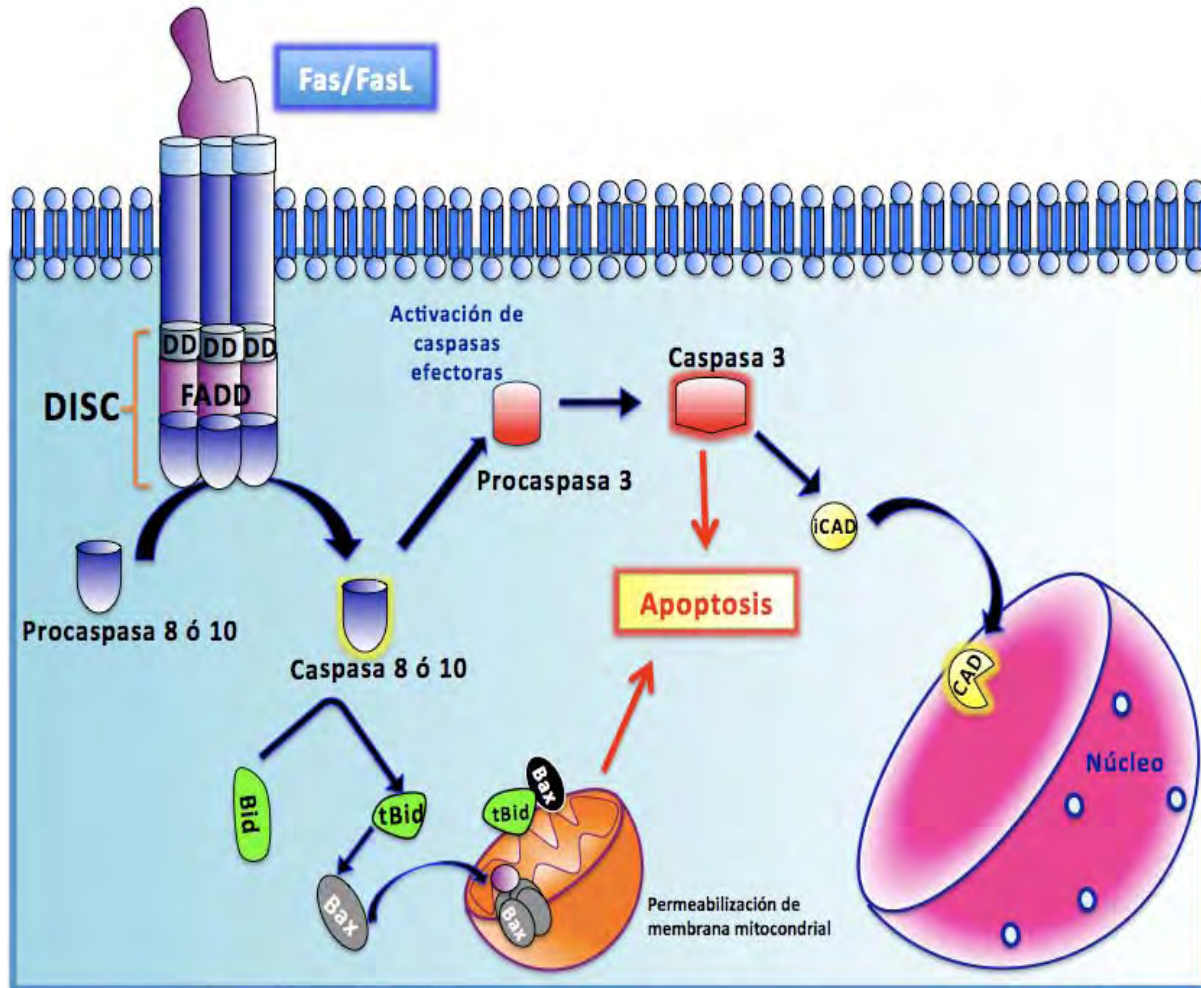


Figura 5. La vía extrínseca o del receptor está mediada por la familia de receptores del TNF. Al interactuar cada receptor con su ligando este se trimeriza favoreciendo el reclutamiento de moléculas adaptadoras como FADD y la procaspasa 8 ó 10; que al interactuar mediante los dominios de muerte (DD, Death Domain) forman el DISC favoreciendo así la autocatálisis proteolítica y activación de la caspasa. Siendo efectora la caspasa 8 ó 10 activan a las caspasas efectoras como la 3, 6 y 7, siendo este el punto de no retorno.



- Vía por p53

p53 es una proteína supresora de tumor que actúa como el guardián del genoma, ya que censa daño al DNA, causando el arresto en ciclo celular temporal o permanente (senescencia), para permitir la reparación del DNA; sin embargo, si esto no es posible induce la apoptosis de la célula. En este último caso, p53 favorece el reclutamiento de un complejo multiproteico llamado PIDDosoma, el cual, induce la activación de la caspasa iniciadora 2; la cual, siendo efectora, activa a las caspasas ejecutoras desencadenando la fase de ejecución de la apoptosis. O bien, p53 promueve la síntesis y la activación de moléculas de dominio único BH3 como PUMA y NOXA, desencadenando la apoptosis mediada por la vía de la mitocondria (Gupta 2001 Vermeulen *et al.* 2005, Brown *et al.* 2005).

Los cuerpos apoptóticos formados son el resultado de la fase de ejecución de la apoptosis; una vez formados la fase de eliminación es llevada a cabo por los macrófagos tisulares o bien por células adyacentes, que fagocitan o endocitan a las células apoptóticas. El reconocimiento y fagocitosis de las células apoptóticas depende de las señales secretadas y expresadas en la superficie celular llamadas señales "find me" e "eat me" captadas por los células fagocíticas profesionales y no profesionales (Jeannin *et al.* 2008, Ravichandran *et al.* 2007).

La lisofosfatidilcolina, producto de la degradación de fosfatidilcolina durante la apoptosis, tiene una actividad de señal "find me"; mientras que la señal "eat me" mejor caracterizada es la fosfatidilserina, la cual se encuentra en el interior de la célula, pero cuando esta muere por apoptosis, sufre rearrreglos en los fosfolípidos de la membrana celular provocando que residuos de fosfatidilserina se expongan al exterior de la célula. Se ha demostrado que la exposición de fosfatidilserina es el evento clave para la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos, además de tener un efecto antiinflamatorio (Jeannin *et al.* 2008, Ravichandran *et al.* 2007).

La apoptosis fisiológica es silenciosa, es decir, es un proceso antiinflamatorio donde no se monta una respuesta inmune, esto debido a que el contenido intracelular no se libera al exterior como en la necrosis; además, los macrófagos tisulares al no censar estímulos inmunogénicos secretan potentes citocinas antiinflamatorias como IL-10 o TGF- β (Tesniere *et al.* 2008b).



Apoptosis Inmunogénica

Se ha considerado que en una persona sana adulta, cada segundo, un millón de células mueren por apoptosis, como producto de la renovación de los tejidos y el recambio celular (Cotter 2009, Tesniere *et al.* 2008a). Este proceso controlado de muerte y proliferación celular mantiene la homeostasis celular y corporal. Las células apoptóticas, durante la apoptosis fisiológica, son endocitadas o fagocitadas rápidamente por células adyacentes o células fagocíticas evitando una necrosis secundaria y que se induzca una respuesta inmune.

En cambio, la primera línea de defensa en contra de patógenos intracelulares es la muerte por apoptosis de la célula infectada, evitando que los patógenos sigan proliferando, se liberen y se propague la infección. Cuando una célula muere por apoptosis en una infección intracelular se induce una respuesta inmune en contra del patógeno. De esta forma; las células infectadas se eliminan a por mecanismos inductores de apoptosis como la interacción Fas/FasL, por la secreción de $TNF\alpha$ o por la secreción de granzima/perforina; estos mecanismos efectores son desencadenados por diversas células del sistema inmune (Vermeulen *et al.* 2005). Así mismo, durante la inmunovigilancia el sistema inmune es capaz de reconocer células transformadas y eliminarlas empleando los mismos mecanismos efectores promoviendo que se induzca un respuesta en contra de la células transformadas lo que evita la aparición de un posible tumor. Recientemente se ha reportado que el estrés inducido en células tumorales por algunos agentes quimioterapéuticos como antraciclinas y oxiplatino o la radiación ionizante y luz UV tipo C (UVC) induce la muerte de las células tumorales por apoptosis y estas desencadenan una respuesta inmune en contra éstas (Stagg 2007, Haynes *et al.* 2008). La diferencia entre la apoptosis fisiológica y la que desencadena un respuesta inmune, llamada apoptosis inmunogénica, es la expresión en la membrana celular y la secreción de ciertas moléculas llamadas DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns). Estas moléculas poseen una actividad funcional particular durante la vida normal celular, pero al ser expresadas y secretadas por células apoptóticas favorecen la fagocitosis de éstas, la activación y maduración de células dendríticas y macrófagos, el procesamiento de antígeno y la activación de los linfocitos T (Green *et al.* 2009).



Los principales DAMPs caracterizados son la expresión de la Calreticulina (CRT) en la membrana celular, que actúa como señal de “eat me”, la secreción de las proteínas de choque térmico (HSPx) y la HMGB1 (High Mobility Group Box 1) que actúan como alarminas (ver Tabla 1) (Green *et al.* 2009, Tesniere *et al.* 2008b).

Tabla 1. DAMPs y sus efectos en células dendríticas (Tabla tomada de ref. Tesniere *et al.* 2008b).

	DAMPs	Efecto en células dendríticas
Moléculas expresadas en la membrana celular	HSP70	↑Presentación de antígeno
	HSP90	↑Presentación de antígeno
	Calreticulina	↑Fagocitosis
	Fosfatidilserina	↑Fagocitosis
Mediadores proinflamatorios	HSP70	Favorece maduración de células dendríticas
	HSP90	↑Presentación de antígeno
	HMGB1	↑Presentación de antígeno

- La Calreticulina

La calreticulina (CRT) es una proteína de 46 kDa altamente conservada codificada por un solo gen de 1.9 kb localizado en el cromosoma 19 en humanos. Esta proteína reside principalmente en el lumen del retículo endoplásmico donde lleva a cabo sus funciones. El análisis estructural de la CRT ha determinado tres principales dominios: el dominio N-terminal de 180 aminoácidos llamado dominio N; el dominio P que es rico en residuos de prolina y actúa como sitio de unión de alta afinidad a Ca^{2+} y la región C-terminal llamada dominio C, que contienen 110 aminoácidos de origen ácido, ricos en residuos de ácido aspártico y ácido glutámico, que de igual forma son capaces de unir Ca^{2+} pero con una menor afinidad (Michalak 1999, Johnson *et al.* 2001).

La CRT posee dos funciones principales en el retículo endoplásmico: i) Actúa como chaperona para el correcto plegamiento de proteínas durante la síntesis de éstas y ii) en la regulación de la homeostasis de Ca^{2+} intracelular (Michalak 1999, Johnson *et al.* 2001).

La CRT es una chaperona tipo lectina que actúa previniendo la agregación de proteínas parcialmente plegadas donde también interviene como un promotor de la



correcta síntesis de proteínas, incluyendo canales iónicos, receptores de membrana, integrinas, transportadores, etc., (Michalak 1999, Johnson *et al.* 2001).

El retículo endoplásmico es el principal almacén de Ca^{2+} intracelular, y su concentración es dos a tres veces mayor en orden de magnitud que la concentración Ca^{2+} en el citoplasma. Las proteínas de unión a calcio como la calreticulina modulan la actividad de moléculas que permiten el flujo del Ca^{2+} hacia el interior del retículo endoplásmico (Michalak 1999, Johnson *et al.* 2001).

Se ha documentado que la CRT tiene un papel importante durante la apoptosis. Ciertos fármacos quimioterapéuticos como las antraciclinas y el oxiplatino inducen la muerte de las células tumorales por apoptosis promoviendo la translocación de la CRT a la membrana celular en etapas tempranas de la apoptosis. El estrés inducido en el retículo endoplásmico por los fármacos favorece la co-translocación de la CRT junto con ERp57 en forma de un complejo proteico a la membrana celular. Ya en la membrana celular, la CRT es reconocida por células dendríticas y macrófagos, aumentando considerablemente la fagocitosis de las células apoptóticas que la exponen, favoreciendo el procesamiento y la presentación de antígeno por células presentadoras de antígeno profesionales (Gardai *et al.* 2005, Obeid *et al.* 2007b, Tesniere *et al.* 2008a y b, Panaretakis *et al.* 2009, Tesniere *et al.* 2009).



ANTECEDENTES

El papel de la CRT en la apoptosis inmunogénica

Recientemente se ha descrito que la Calreticulina (CRT) tiene un papel fundamental en la apoptosis inmunogénica, ya que la expresión de esta molécula en la membrana citoplasmática de las células en apoptosis favorece la inducción de la respuesta inmune. Se ha descrito que bajo ciertas condiciones, células en apoptosis externalizan la CRT en la membrana celular y su externalización está relacionada directamente con un aumento en la fagocitosis de las células apoptóticas (Gardai *et al.* 2005 y Obeid *et al.* 2007b).

En experimentos realizados *in vitro* con líneas de fibroblastos embrionarios de ratón CRT^{+/+} y CRT^{-/-} inducidos a apoptosis mediante la exposición a luz UV, se observó que los fibroblastos CRT^{+/+} expresan la CRT en la membrana celular lo que se asoció con el incremento del índice de cuerpos apoptóticos fagocitados por células fagocíticas profesionales y no profesionales, lo anterior en comparación con los fibroblastos CRT^{-/-}. Además, la adición de CRT recombinante a las células apoptóticas CRT^{-/-} restableció índices similares de fagocitosis (Gardai *et al.* 2005).

En estudios subsecuentes llevados a cabo en líneas tumorales de origen murino como: CT26 de carcinoma de colon, B16-F1 de melanoma, MCA205 de fibrosarcoma y TS/A de carcinoma de mama; y de origen humano como: HCT116 de cáncer de colon, A-549 de carcinoma de pulmón y HeLa de cáncer cervical, los fármacos quimioterapéuticos como mitomicina c, etopósido, cisplatino, etc., inducen apoptosis en las líneas tumorales y algunos de estos fármacos como: las antraciclinas y el oxiplatino, así como la luz UVC y la radiación ionizante, además, favorecen la co-translocación del complejo CRT/ERp57 a la membrana celular, evento que se observa aún antes de se externalice la fosfatidilserina, lo cual ha sido considerado como un evento temprano en la apoptosis (Obeid *et al.* 2007b y Panaretakis *et al.* 2008). De igual forma, la externalización de CRT a la membrana celular, por efecto de los fármacos, se asoció con el incremento de la fagocitosis de las células tumorales por células dendríticas. (Obeid *et al.* 2007a y b, Panaretakis *et al.* 2008).

Estudios subsecuentes en modelos animales confirmaron la importancia y el papel que juega la externalización de la CRT en la apoptosis inmunogénica. La administración a



ratones inmunocompetentes de células CT26 de carcinoma de colon tratadas con diferentes inductores de apoptosis que promueven la externalización de la CRT como: la luz UVC, las antraciclinas, el oxiplatino, etc., causó que en los animales que recibieron un segundo inóculo con células tumorales vivas sin tratamiento no se detectara desarrollo tumoral, esto comparado con animales que inicialmente fueron inoculados con células tumorales que no externalizaron CRT, donde se detectó desarrollo tumoral en el sitio de inóculo.

Se determinó de esta manera que el inóculo primario confirió una protección antitumoral sólo a aquellos ratones donde las células tumorales apoptóticas externalizaron la CRT. Estos hallazgos indicaron que existe una inmunogenización exitosa y permanente que le confiere protección a los ratones en contra del posible desarrollo tumoral mediado por la expresión de la CRT (Obeid *et al.* 2007a, Panaretakis *et al.* 2009, Tesniere *et al.* 2009).

- Factores moleculares involucrados en la externalización de CRT durante la apoptosis inmunogénica

El mecanismo por el cual la CRT se transloca a la membrana celular todavía no está bien esclarecido pero se han identificado varios fenómenos moleculares intracelulares que intervienen en la externalización de la CRT.

El daño genotóxico ejercido a la célula por fármacos como la campotecina, la mitomicina c o el cisplatino no son suficientes para inducir la externalización de la CRT; en cambio, análogos genotóxicos como las antraciclinas y el oxiplatino si favorecen la externalización de la CRT. Al inducir apoptosis a células CT26, a las que se les retiró el núcleo, mediante la exposición a antraciclinas se observó que estas células son capaces de translocar la CRT a la membrana celular, por lo que el daño al DNA no es determinante para la externalización de la CRT (Obeid *et al.* 2007b). Uno de los mecanismos de acción citotóxica que comparten las antraciclinas, el oxiplatino y la radiación ionizante es que generan especies reactivas de oxígeno (ROS). Al probar diferentes antioxidantes, durante la inducción de apoptosis en células CT26 con antraciclinas, se observó que los antioxidantes favorecen la sobrevivencia celular y evita la externalización de la CRT, probando que la generación de estrés oxidativo favorece la externalización de la CRT (Panaretakis *et al.* 2008).



Otro de los factores moleculares que se ha observado, durante la apoptosis inducida por antraciclinas, es que favorecen la fosforilación y activación de PERK (PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase); la cual es una cinasa inducida por estrés a nivel del retículo endoplásmico. PERK fosforila a eIF2 α , la cual asiste para que la CRT junto con ERp57 sean translocadas del lumen del retículo endoplásmico hacia el aparato de Golgi y posteriormente a la membrana celular mediante el sistema de transporte por vesículas excretoras llamadas SNAREs (SNAP, Soluble NSF Attachment Protein, Receptors). La inhibición de la fosforilación de PERK, eIF2 α o del sistema de transporte SNARE inhibe la externalización de la CRT. (Panaretakis *et al.* 2009, Garg *et al.* 2010).

Se ha identificado que la activación de las caspasas, específicamente la caspasa 8, también están involucradas en la externalización de la CRT. Las antraciclinas y el oxiplatino favorecen la activación de la caspasa 8, por un mecanismo todavía desconocido; una vez activada esta caspasa escinde a Bap31 generando un subproducto proapoptótico llamado p20 que interactúa con proteínas de la familia de BCL-2, como BAX y BAK favoreciendo la activación de éstas. La inhibición de la caspasa 8, de la escisión de Bap31 o del subproducto p20, así como de BAX o BAK, responsables de la permeabilización de la membrana mitocondrial durante la inducción de apoptosis con antraciclinas, inhiben la externalización de la CRT. (Panaretakis *et al.* 2009 y Garg *et al.* 2010) .

Los mecanismos moleculares hasta ahora descritos funcionan de forma coordinada de tal manera que la carencia de alguno de ellos puede evitar que durante la inducción de apoptosis no se externalice la CRT. (Obeid *et al.* 2009).

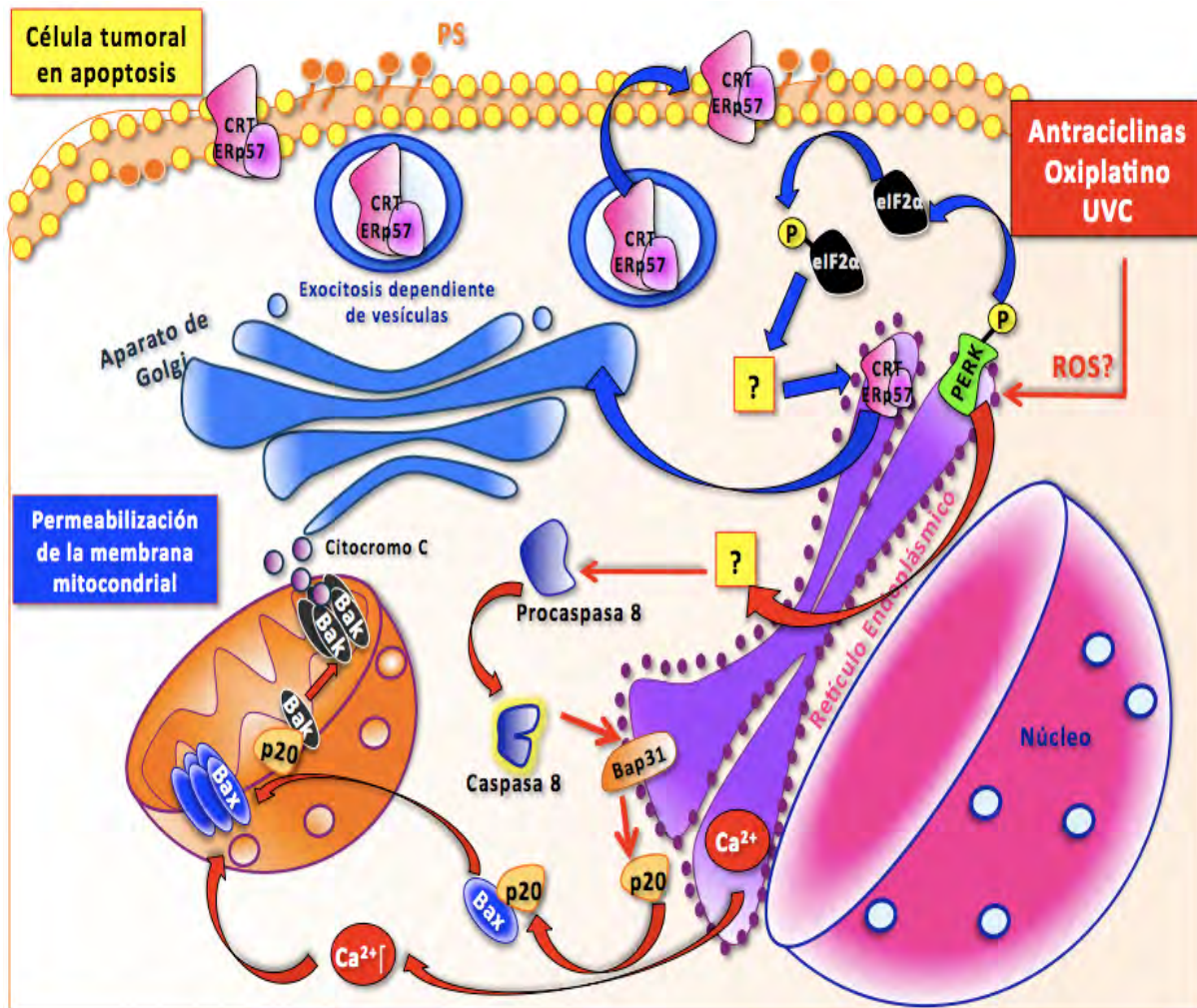


Figura 1. Vía de externalización de la CRT/ERp57 durante la inducción de apoptosis mediada por la exposición a antraciclinas, oxiplatino o luz UVC. Los inductores de apoptosis activan dos vías principales de señalización, la representada por flechas rojas correspondientes a la inducción de apoptosis y por flechas azules correspondiente a la vía de translocación de la CRT a la membrana celular. Ambas vías se originan en torno a la activación de PERK vía la generación de estrés en el RE; posteriormente PERK fosforila y activa a eIF2 α , la cual, asiste para la translocación del complejo CRT/ERp57 vía las vesículas excretoras SNARE del lumen del RE al aparato de Golgi hasta la membrana celular. Paralelamente, la vía apoptótica es orquestada coordinadamente para favorecer la externalización de la CRT mediante la activación de la caspasa 8, la posterior escisión de Bap31 y la generación del subproducto p20, la activación de BAX y BAK y la salida de Ca²⁺ del RE. Es importante resaltar que a pesar de inhibir las vías mencionadas y por lo tanto inhibir la translocación de la CRT a la membrana celular, la muerte celular persiste (Figura editada de referencia Garg *et al.* 2010).



JUSTIFICACIÓN

A pesar que en algunos tipos de cáncer, como en el mama, próstata y colón, se han obtenido avances importantes en su tratamiento, en otros casos, como en el cáncer pulmonar, el tratamiento ha sido poco efectivo; incluso en casos donde aparentemente ha sido eliminado el tumor (total remisión), micrometástasis o células tumorales latentes residuales a menudo favorecen el desarrollo neotumoral (Obeid *et al.* 2007a).

Con el fin de eliminar la reincidencia tumoral se han planteado varias soluciones; se ha propuesto el diseño de estrategias para la eliminación de células tumorales residuales por medio de posibles tratamientos quimioterapéuticos secundarios o adyuvantes al tratamiento primario o bien, la estimulación del sistema inmune favoreciendo la respuesta inmune en contra de células tumorales residuales. En este segundo punto, la inducción de la muerte inmunogénica de las células tumorales por medio del tratamiento quimioterapéutico permitiría la intervención del sistema inmune para la erradicación de las células tumorales residuales, por lo que la inducción de la muerte celular inmunogénica se ha planteado como uno de los principales objetivos de los nuevos tratamientos quimioterapéuticos. Esto es importante ya que la quimioterapia sería óptima si se promueve la muerte celular inmunogénica provocando una respuesta inmunológica que elimine a las células tumorales residuales. Por lo tanto, es importante conocer los agentes que inducen apoptosis inmunogénica así como el mecanismo molecular por el cual estos agentes quimioterapéuticos u otros estímulos provocan este fenómeno, con el fin de desarrollar fármacos que promuevan la muerte celular inmunogénica. De igual forma, es necesario evaluar si las células tumorales de cáncer pulmonar externalizan la CRT en respuesta al tratamiento con cisplatino, ya que es el fármaco de elección en la terapia de este tipo de cáncer.

La falla del tratamiento quimioterapéutico puede estar relacionado directamente con la incapacidad de las células tumorales de morir por apoptosis inmunogénica o la incapacidad de los fármacos de favorecer la muerte inmunogénica (Obeid *et al.* 2007a, 2009).



HIPÓTESIS

Si un inductor de apoptosis favorece la translocación de la CRT a la membrana celular en líneas de carcinoma pulmón, entonces habrá un mayor porcentaje de fagocitosis de dichas células por macrófagos.

OBJETIVOS

- Determinar la presencia de calreticulina en la membrana citoplásmica de células de carcinoma pulmonar tratadas con agentes inductores de apoptosis.
- Discernir si el cisplatino promueve la translocación de calreticulina a la membrana citoplásmica de células de carcinoma pulmonar.
- Determinar si la translocación de calreticulina a la membrana citoplásmica favorece un aumento de la fagocitosis de las células de carcinoma pulmonar por macrófagos



MATERIALES Y MÉTODOS

- Líneas celulares y Reactivos

Se emplearon las siguientes líneas celulares tumorales: A-427 y A-549 de tipo adenocarcinoma pulmonar y Calu-1 de tipo carcinoma epidermoide pulmonar, obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC Rockville, MD, USA). Se empleó la línea 1.3.11, la cual se estableció en laboratorio de Cáncer Pulmonar a partir del derrame pleural proveniente de un paciente sin tratamiento con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar previamente caracterizadas (López González et al., 1998). Se utilizó además la línea de macrófagos THP1 proveniente de leucemia monocítica aguda humana también obtenida de la ATCC.

Todas las líneas tumorales empleadas presentaron características de adhesión durante su cultivo con excepción de los macrófagos THP1. Las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI-1640 (Sigma Aldrich Co, St. Louis, MO) suplementado al 10% de suero fetal bovino (Hyclone Logan, Utah) y 1% de antibióticos a una concentración de 100 U/mL de bencilpenicilina y 100 µM/mL de estreptomycin. Los cultivos celulares se mantuvieron en incubación en atmósfera húmeda al 5% de CO₂ a 37° C. Al llegar a subconfluencia, las células adherentes se trataron con solución de tripsina al 0.05% y agitación mecánica para su desprendimiento. Se determinó la viabilidad de las líneas celulares tumorales posterior al desprendimiento mediante tinción por exclusión con azul tripano y siempre correspondió a valores mayores al 90%. El conteo y ajuste de concentración de células tumorales para los distintos ensayos se realizó empleando la cámara de Neubauer.

Reactivos	Casa comercial
Campotecina	Sigma Aldrich Co, St. Louis, MO.
Cisplatino	Accocit 50mg/50mL Accord Farma S.A. De C.V. México D. F.
Anexina V marcada con isotiocianato de fluoroceína (FITC)	BioLegend San Diego, CA. Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, CA.
Ioduro de propidio (PI)	Sigma Aldrich Co, St. Louis, MO.
Alamar azul	Invitrogen, CA.
Kit PKH26	Sigma Aldrich Co, St. Louis, MO.



Anticuerpos	Clase	Casa Comercial	Clona
Anti-CRT humana	IgG hecho en conejo	Sigma Aldrich Co, St. Louis MO.	Policlonal
Anti-IgG de conejo marcado con ficoeritrina (PE)	IgG hecho en burro	BD Biosciences San Jose, CA.	Policlonal
Anti-CD45 humano marcado con PE-Cy5	IgG	BD Pharmigen San Jose, CA.	HI30
Anti-Fas humano	IgM	MBL Medical & Biological Laboratories Naka-ku, Nagoya Japón.	CH11

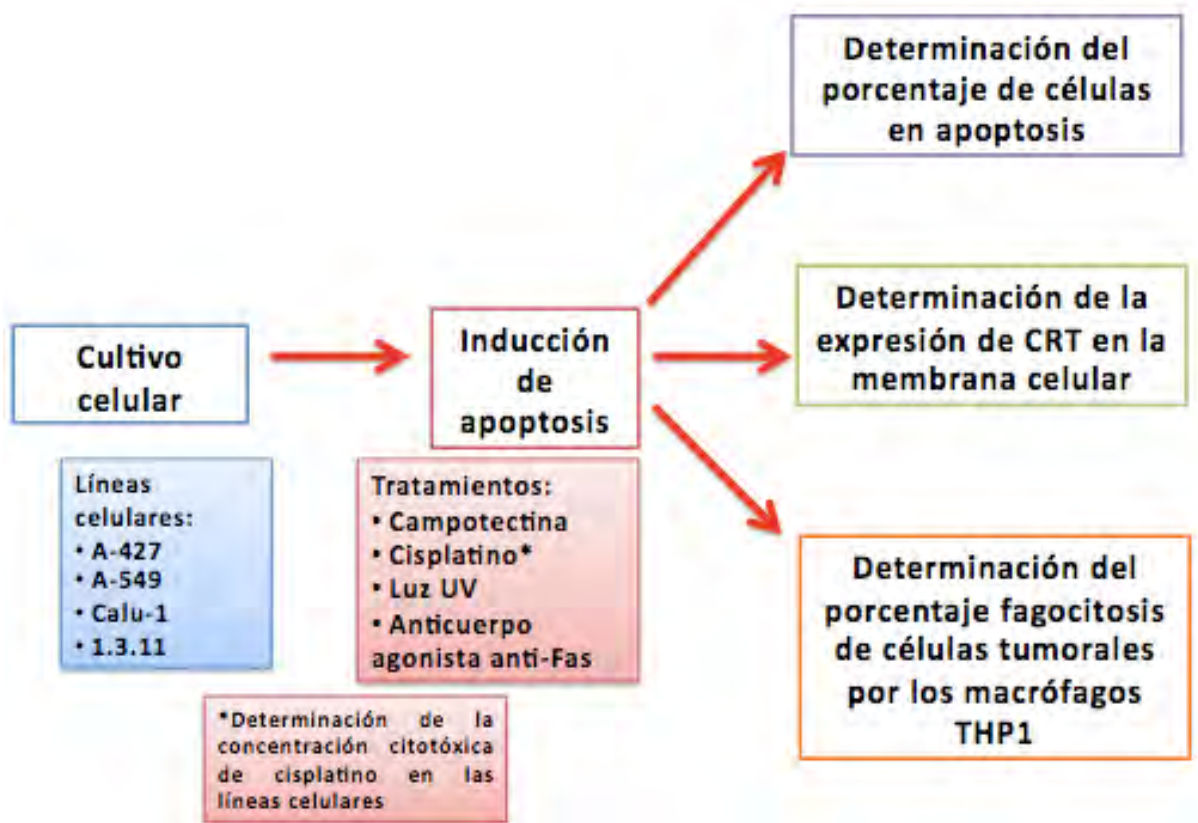


Figura 1. Esquema general de la metodología llevada a cabo para el protocolo experimental. Se cultivaron diferentes líneas de carcinoma pulmonar a las cuales se les indujo apoptosis mediante diferentes tratamientos y se les determinaron tres diferentes parámetros: 1) El porcentaje de células en apoptosis. 2) El porcentaje de células que expresan CRT. 3) El porcentaje de células tumorales fagocitadas por los macrófagos THP1.



- Inducción de apoptosis por campotecina, anticuerpo agonista anti-Fas y exposición a luz UV.

Se adicionaron 10^5 células A-427 en suspensión en medio RPMI 1640 suplementado a los pozos de placas de 24 pozos; en un volumen final de 1 mL bajo las siguientes condiciones: 1) Anticuerpo agonista anti-Fas a una concentración de 2.5 $\mu\text{g/mL}$ previamente adsorbido a la placa para la inducción de apoptosis, 2) disolución de campotecina a una concentración final de 2.5 μM , 3) exposición a luz UV durante 1' y 4) medio de cultivo RPMI suplementado sin tratamiento. La placa se incubó durante 4 ó 24 h a 37° C. Terminado el tiempo de incubación se llevó a cabo la determinación del porcentaje de células en apoptosis así como del porcentaje de células que expresan CRT en la membrana celular (ver adelante).

- Inducción de apoptosis por cisplatino

Se adicionaron 10^5 células A-427, A-549, Calu-1 y 1.3.11 en suspensión en medio RPMI 1640 suplementado a los pozos de placas de 24 pozos; posteriormente, se adicionó un alícuota de la disolución de cisplatino para completar a un volumen final de 1 mL a las siguientes concentraciones finales de cisplatino: 25, 50, 100 y 200 μM . La placa se incubó durante 6 h a 37° C. Terminado el tiempo de incubación se llevó a cabo la determinación del porcentaje de células en apoptosis y del porcentaje de éstas que expresan CRT en la membrana celular (ver adelante).

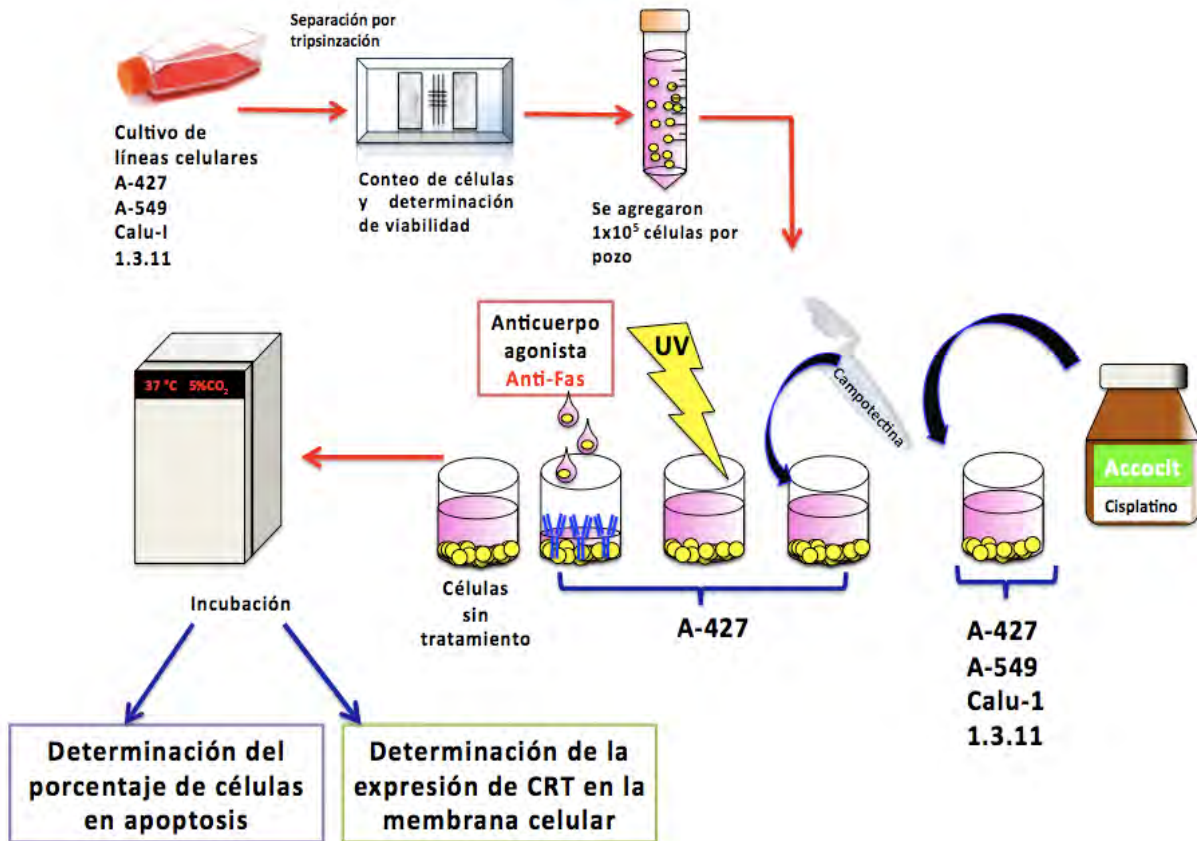


Figura 2. Metodología empleada para la inducción de apoptosis por diferentes tratamientos.

- Determinación del porcentaje de células en apoptosis

Posterior a la inducción de apoptosis se determinó el porcentaje de células tumorales en apoptosis mediante el marcaje con Anexina V FITC/PI. Se recuperaron las células tumorales de la placa de 24 pozos mediante agitación mecánica suave en tubos falcon para citómetro (Beckton Dickinson NJ), después de un lavado con PBS mediante centrifugación a 1500 rpm durante 5', se resuspendió en 100 μ L de disolución de marcaje conteniendo Anexina V FITC/PI en amortiguador HEPES como lo indica el fabricante. Las suspensiones de células se incubaron durante 15' a temperatura ambiente en obscuridad; posteriormente, se adicionaron 200 μ L de amortiguador HEPES para un volumen final de 300 μ L. Las suspensiones celulares se analizaron

mediante citometría de flujo utilizando un citómetro FACScalibur Becton Dickinson empleando el programa de adquisición y análisis Cell Quest. Se utilizó un haz de excitación de 488 nm y un filtro con paso de banda de 515 nm para la detección de las células apoptóticas marcadas con Anexina V FITC y un filtro >600 nm para la detección de PI intercalado al DNA en las células tumorales. En todas las determinaciones se adquirieron 10^4 eventos por cada muestra para su análisis.

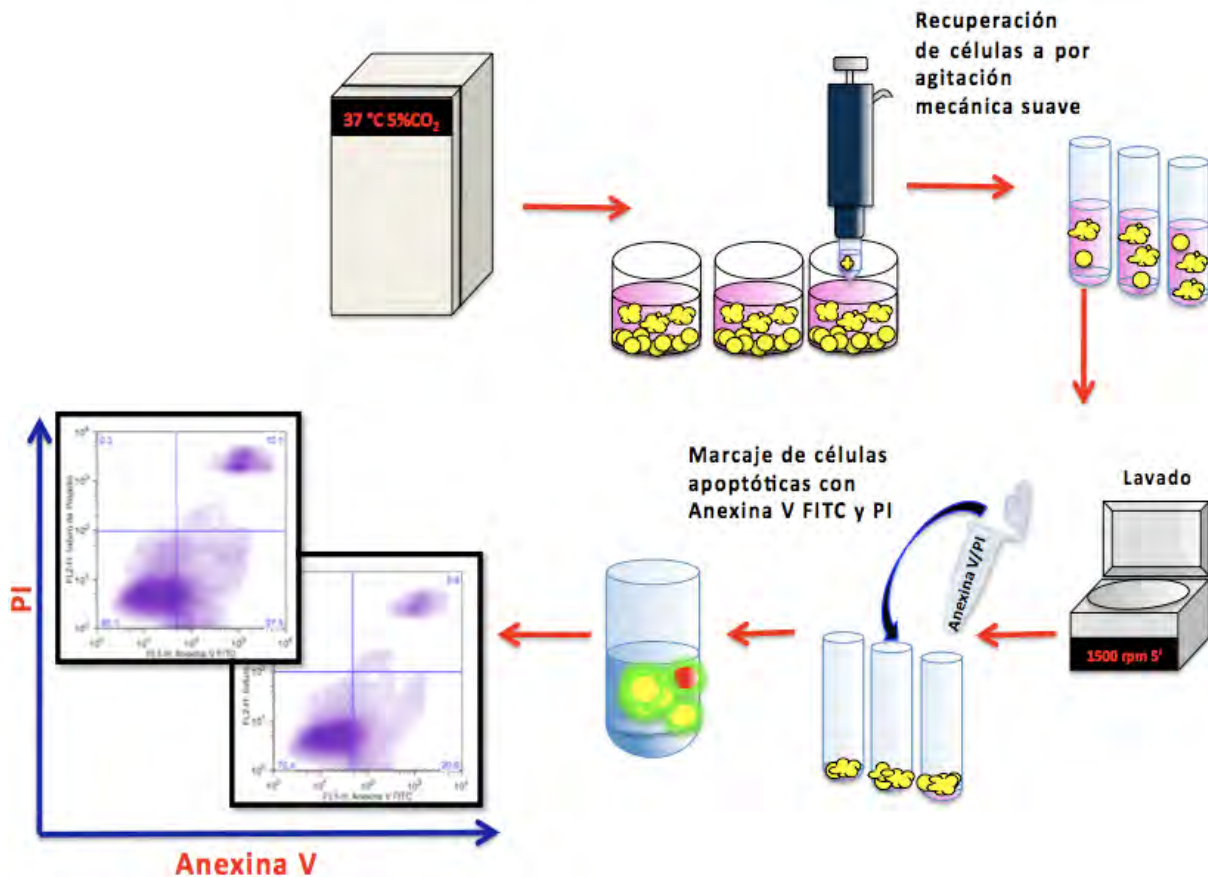


Figura 3. Metodología empleada para la determinación del porcentaje de células en apoptosis. La anexina V se une a residuos de fosfatidilserina (PS) expresada en la membrana citoplásmica de células en apoptosis temprana, mientras que el PI se intercala en el DNA solo cuando la membrana celular a perdido su integridad durante apoptosis tardía o en necrosis.



- Determinación del porcentaje de células que externalizan CRT a la membrana celular

Después de la inducción de apoptosis se recuperaron las células tumorales de la placa de 24 pozos mediante agitación mecánica suave en tubos falcon para citómetro, se lavaron con PBS/BSA y se resuspendió en 100 μ L de solución de marcaje con anticuerpo anti-CRT humana diluido 1:200 en amortiguador PBS/BSA. Las suspensiones celulares se incubaron durante 45' a temperatura ambiente en agitación; posteriormente, se lavó y se resuspendió en 100 μ L de solución de anticuerpo anti-IgG PE en PBS/BSA, como marcaje secundario, a una relación de 1 μ L de anticuerpo por cada 10^6 células, como lo indica el fabricante. Los tubos se incubaron nuevamente a temperatura ambiente, a oscuridad y agitación durante 30'. Finalizado el tiempo de incubación, la suspensión celular se lavó y se fijó en p-formaldehído al 1% en amortiguador PBS. Las suspensiones celulares se analizaron mediante citometría de flujo empleando el canal FL2 para la detección de la marca de ficoeritrina (PE) del anticuerpo secundario.

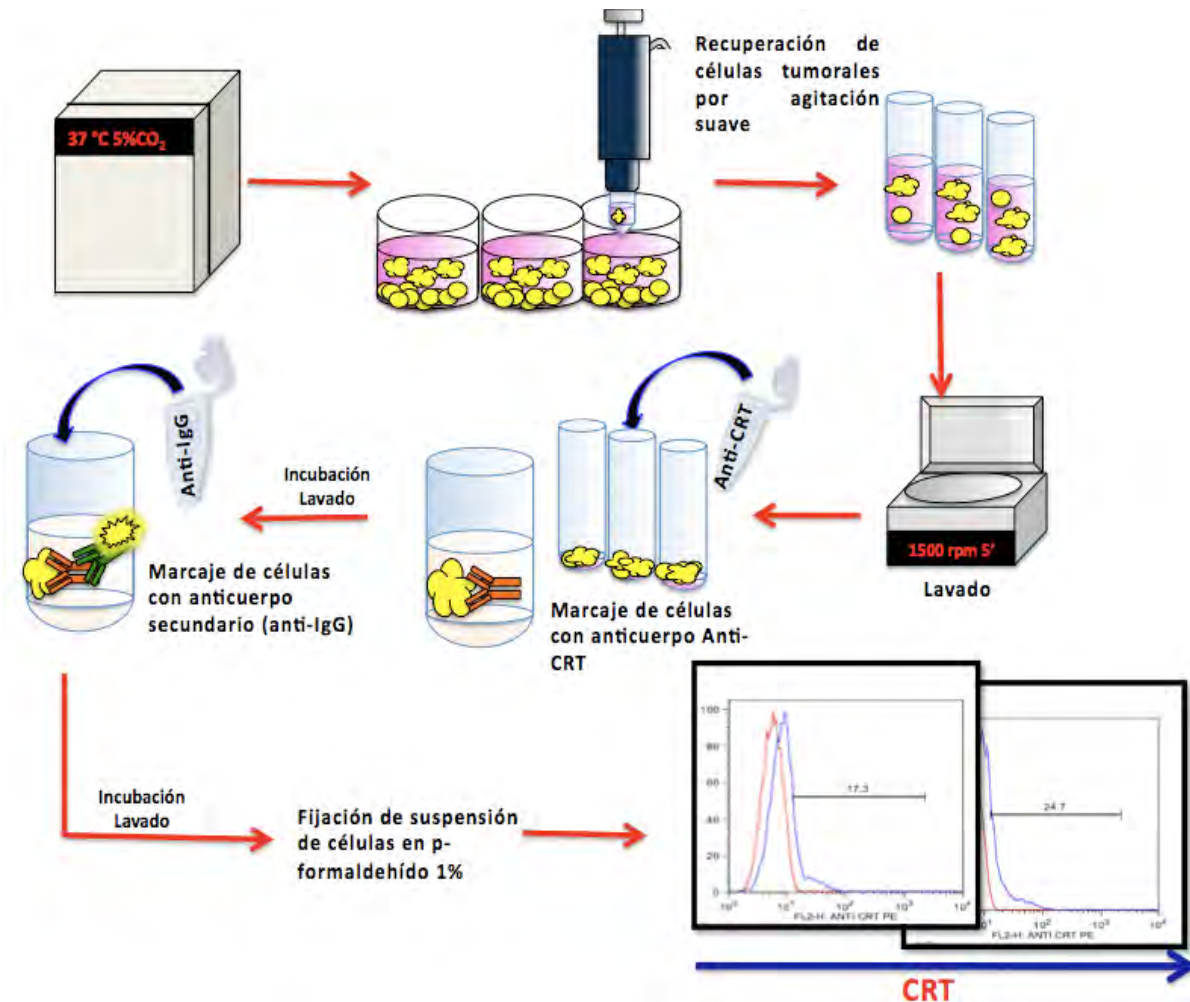


Figura 4. Metodología experimental para la determinación del porcentaje de células que expresan CRT en la membrana celular debido a los diferentes inductores de apoptosis.

- Marcaje de las células A-427 con PKH26 para el ensayo de fagocitosis

Previamente a la inducción de apoptosis se marcaron las células tumorales A-427 con el kit de PKH26; el cual, es un fluorocromo que se intercala en la membrana celular sin dañar a la célula. Se empleó el siguiente procedimiento: Una vez desprendidas las células tumorales del cultivo celular, se lavaron dos veces con medio RPMI 1640 sin suplementar en un tubo falcon para citómetro. Posteriormente se resuspendió en 100 μ L de diluyente C del kit PKH26 y se adicionó 100 μ L de disolución de PKH26 [1:100] en diluyente C, como lo indica el fabricante. La suspensión celular se mantuvo en



agitación, en oscuridad a temperatura ambiente durante 5'. Terminado el tiempo de incubación se adicionó 1 mL de suero fetal bovino y 4 mL de RPMI suplementado. Se lavó la suspensión de células con RPMI 1640 suplementado y se resuspendió en el mismo medio. Se hizo el conteo de células con la cámara de Neubauer y se determinó la viabilidad mediante exclusión con azul tripano.

- Determinación del porcentaje de células tumorales fagocitadas por los macrófagos THP1

Posteriormente al marcaje de las células tumorales A-427 con PKH26, se les indujo la muerte por apoptosis mediante la metodología previamente descrita. Después de la incubación, las células tumorales marcadas con PKH26 se recuperaron mediante agitación mecánica suave, se lavaron con RPMI 1640 suplementado y se resuspendieron en el mismo medio. A las suspensiones de células tumorales se adicionó los macrófagos THP1 en una relación de 5 macrófagos por célula tumoral, a un volumen final de 1 mL. Los cocultivos se incubaron durante 4 h a 37°C. Posterior a la incubación, las suspensiones celulares se lavaron con PBS/BSA y se resuspendieron en solución de marcaje con anticuerpo Anti-CD45 marcado con PE-Cy5 en PBS/BSA. La suspensión celular se incubó a temperatura ambiente, en oscuridad y agitación durante 30'. Terminado el tiempo de incubación se lavaron las suspensiones celulares con PBS/BSA y se fijaron en p-formaldehído 1% en PBS para su posterior análisis mediante citometría de flujo. Se empleó el canal FL2 para la detección de la marca del PKH26 y el canal FL3 para la detección de la marca PE Cy5 del anticuerpo anti-CD45.

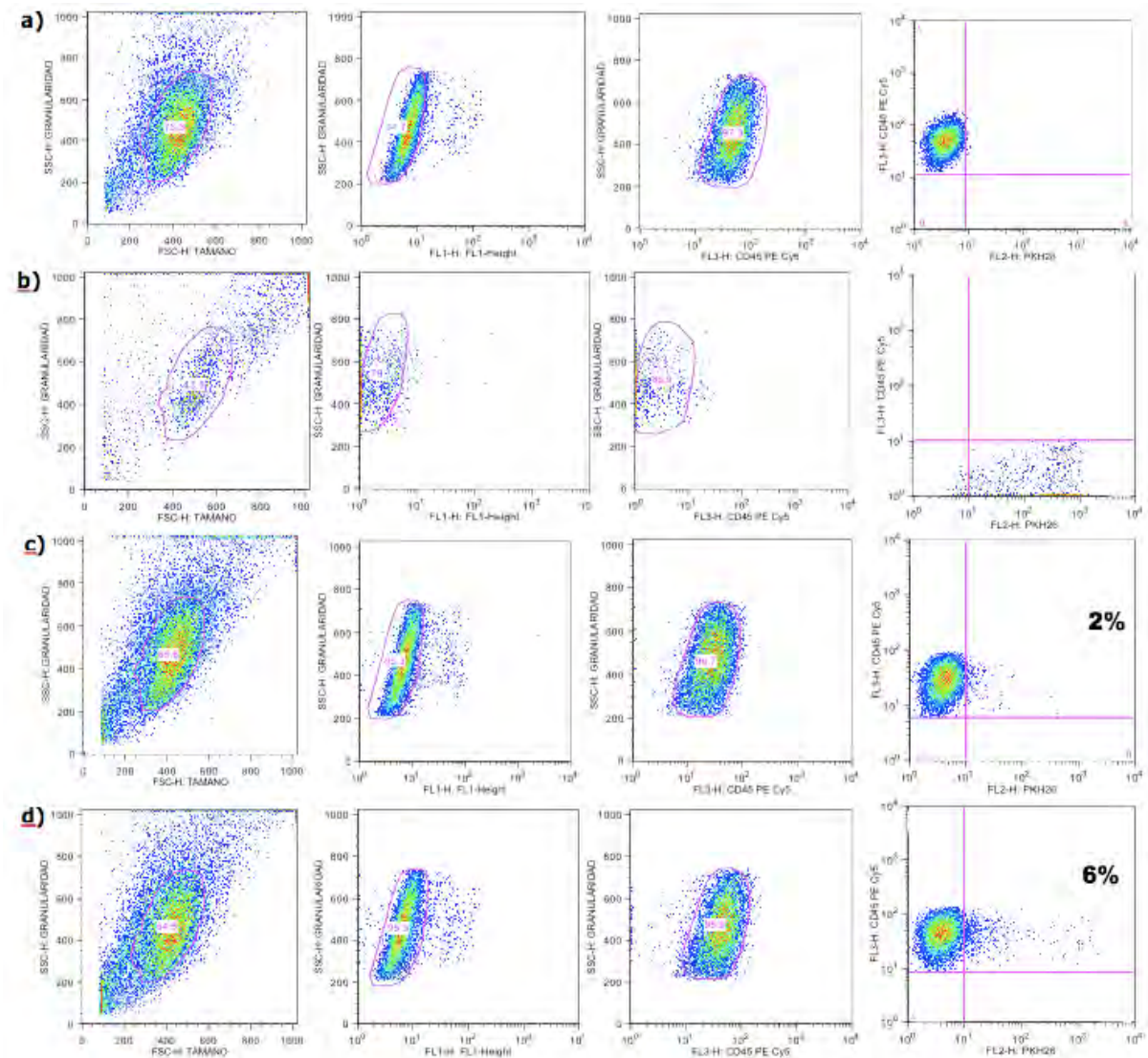


Figura 5. Gráficas de densidad representativas del análisis llevado a cabo para la determinación del porcentaje de células A427 fagocitadas por los macrófagos THP1 a partir de 15 000 eventos adquiridos al citómetro por muestra. (a) Macrófagos THP1 marcados con el CD45 PE-Cy5, (b) células A-427 marcadas con PKH26, (c) cocultivo de macrófagos y células tumorales sin tratamiento y (d) cocultivo con los macrófagos y las células tumorales tratadas con luz UV. El PKH26 es un fluorocromo que se intercala a la membrana citoplasmática sin dañar a la célula tumoral; los macrófagos que sean reconocidos por el citómetro con las dos marcas, tanto del PKH26 como del anticuerpo anti-CD45 PE-Cy5, corresponden a los macrófagos que han fagocitado células tumorales.



**Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Química**



- Análisis Estadístico

El análisis de los datos adquiridos en el citómetro fue realizado con el programa de computo WinMDI 2.9 y FlowJo 9.0

Para determinar si existen diferencias significativas entre la expresión de CRT en la membrana celular así como el porcentaje de fagocitosis, causada por los tratamientos con respecto a los controles, a los resultados obtenidos se les realizó análisis de varianza y la prueba de Tukey utilizando el programa Prism 5.



RESULTADOS

- Apoptosis en la línea A-427 inducida por campotecina, luz UV y anticuerpo agonista anti-Fas.

Se determinó el porcentaje de células A-427 en apoptosis a las 4 y 24 h de tratamiento con campotecina, exposición a luz UV y el anticuerpo agonista anti-Fas utilizando el marcaje con Anexina V FITC y PI (Kroemer 2009). Para distinguir entre las células viables de las células en apoptosis temprana y apoptosis tardía o necrosis se obtuvieron las gráficas de puntos obtenidas mediante el análisis por citometría de flujo (Figura No 1).

Los resultados de los diferentes tratamientos de inducción de apoptosis se compararon con los obtenidos con células tumorales A-427 sin tratamiento; además, se incluyó una condición en la cual se indujo la necrosis de células tumorales mediante ciclos de congelación y descongelación.

En general, los diferentes tratamientos indujeron alrededor de un 30% de células en apoptosis temprana a las 4 h (ver Figura 1a). El anticuerpo anti-Fas indujo el mayor porcentaje de células en apoptosis temprana y este mismo comportamiento se acentuó a las 24 h. El tratamiento con la campotecina y luz UV incrementaron el porcentaje de células en apoptosis tardía a las 24 h (ver Figura 1a y 1b).

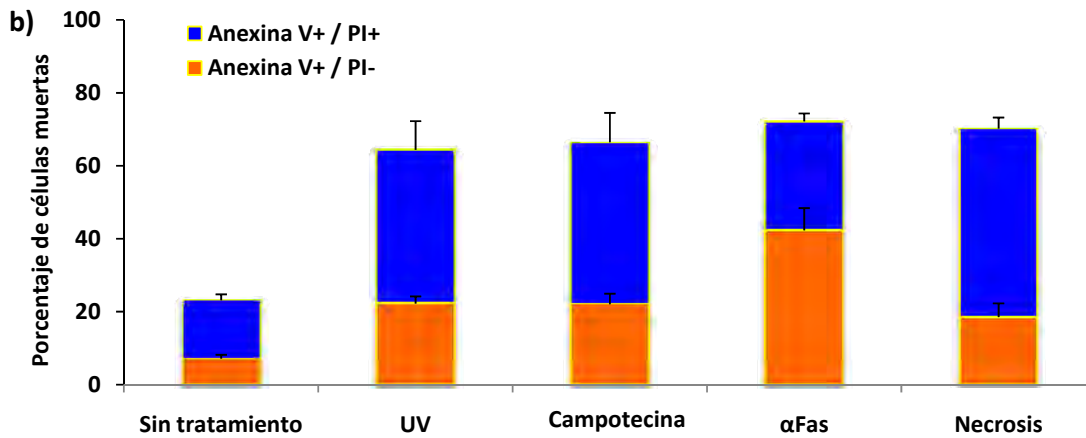
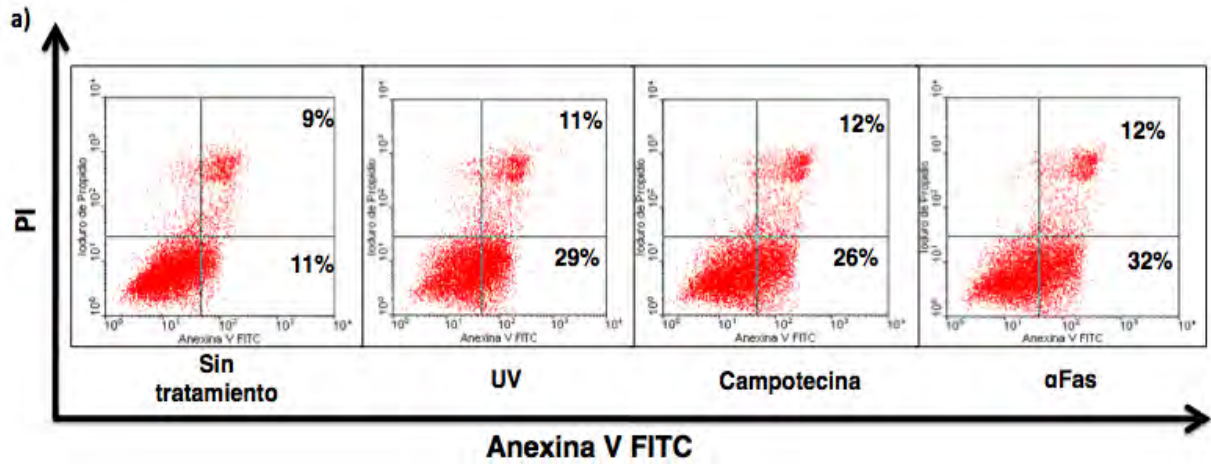


Figura 1. Porcentaje de células A-427 en apoptosis a las 4 y 24 h de tratamiento. (a) Gráficas de puntos representativas de uno de tres experimentos independientes donde se ilustra las células viables Anexina V-/PI- (cuadrante inferior izquierdo), en apoptosis temprana Anexina V+/PI- (cuadrante inferior derecho), en apoptosis tardía o necrosis secundaria Anexina V+/PI+ (cuadrante superior derecho) y las necróticas Anexina V-/PI+ (cuadrante superior izquierdo) a las 4 h de tratamiento. (b) Porcentaje de células en apoptosis temprana (Anexina V+/PI-) y en apoptosis tardía o necrosis (Anexina V+/PI+) a las 24 h de inducción de apoptosis (Medias \pm D.E., n=3).



- Detección de Calreticulina en la membrana citoplásmica de las células A-427.

Una vez establecido que los tratamientos (campotecina, la exposición a luz UV y el anticuerpo agonista anti-Fas) inducen apoptosis, se determinó si promueven, en las células tumorales, la externalización de la CRT.

Los resultados obtenidos se muestran como histogramas de número de eventos vs la intensidad de fluorescencia debida a la CRT-PE. Los tratamientos se compararon con relación a células sin tratamiento (control); además, se incluyó un control de necrosis para determinar si en este tipo de muerte induce el marcaje de la CRT.

La intensidad de fluorescencia obtenida de todos los tratamientos y los controles fueron comparados con la señal emitida por células tumorales A-427 (expuestas a luz UV) marcadas únicamente con el anticuerpo secundario.

El análisis de los resultados demostró que el tratamiento con luz UV no induce no induce la externalización de la CRT en la línea A-427 obteniendo porcentajes similares de células CRT+ que el control a las 4 y 24 h post-tratamiento (ver Figura 2a, 2b y 2c). El anticuerpo anti-Fas indujo un mayor porcentaje de células apoptóticas CRT+ con respecto al control a las 4 h de inducción de apoptosis siendo las diferencias entre condiciones estadísticamente significativas; sin embargo, a las 24 h de tratamiento las células tumorales no expresaron CRT en la membrana citoplásmica (ver Figura 2a, 2b y 2c).

La campotecina indujo un aumento no significativo en el porcentaje de células CRT+ con respecto al control a las 4 h de exposición al fármaco; no obstante, el porcentaje de células CRT+ fue ligeramente mayor a las 24 h, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre el control y el tratamiento (ver Figura 2a, 2b y 2c).

La Figura 2c representa la intensidad media de fluorescencia relativa (IMFr) debida a la expresión de CRT en la membrana celular con respecto al tratamiento incluyendo los controles sin tratamiento y necrosis. La IMFr es el resultado del cociente de la intensidad media de fluorescencia del tratamiento entre la intensidad media de fluorescencia de la referencia (células A-427 marcadas sólo con anticuerpo secundario). Si la IMFr es mayor a la del control sin tratamiento se determina que hay expresión de CRT en la membrana celular. Se determinó que sólo la IMFr del



**Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Química**



tratamiento con campotecina y con el anticuerpo anti-Fas son mayores que la del control sin tratamiento, alcanzando la significancia estadística. Por lo que, nuestros resultados indican que sólo el anticuerpo anti-Fas induce la translocación de CRT a la membrana celular en etapas tempranas de la inducción de apoptosis.

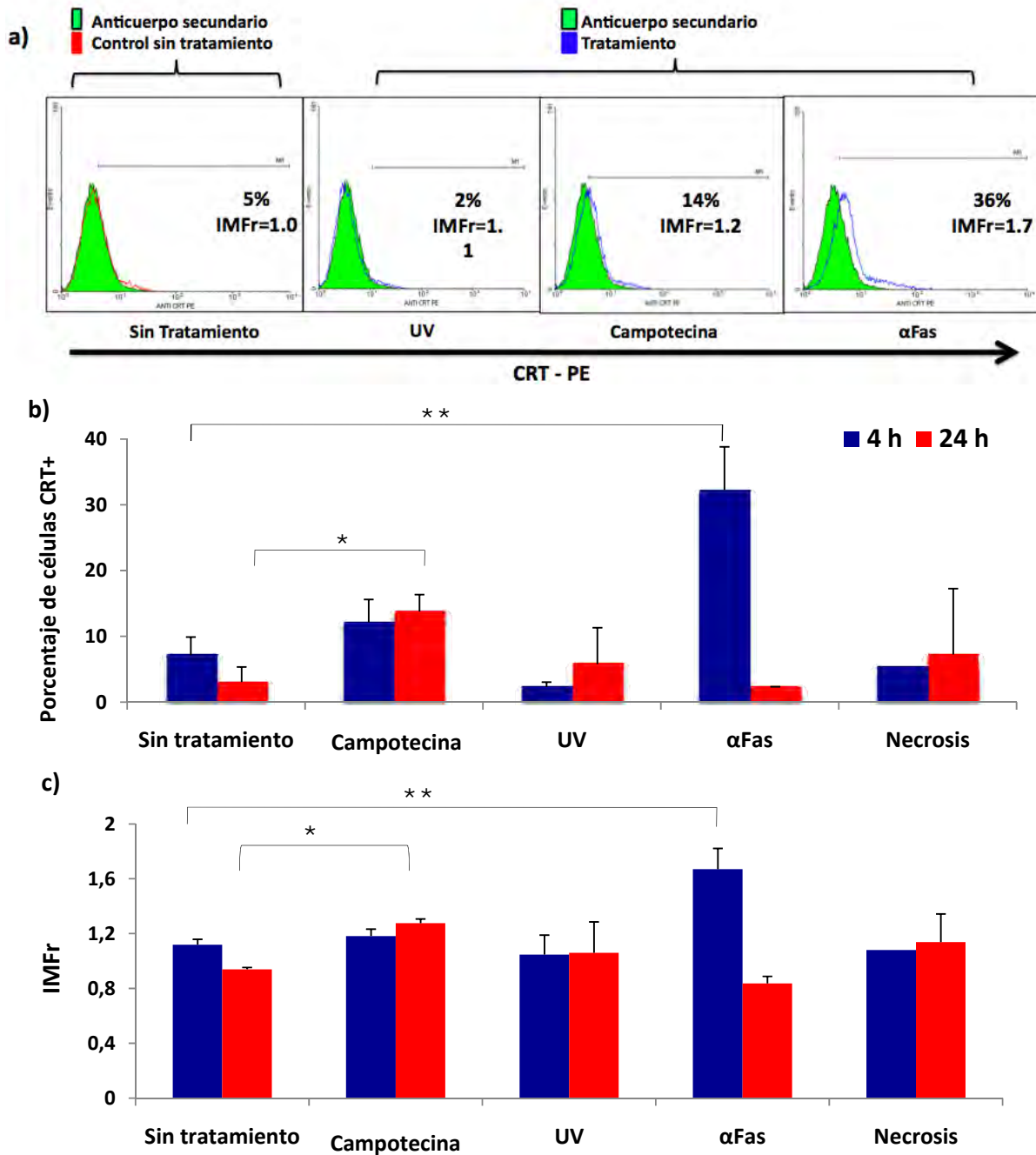


Figura 2. Determinación de CRT en la membrana citoplásmica en células A-427 bajo diferentes tratamientos. (a) Histogramas de intensidad de fluorescencia representativos de tres experimentos independientes a las 4 h de inducción de apoptosis para la determinación de la externalización de CRT. (b) Porcentaje de células CRT+ a las 4 y 24 h de inducción de apoptosis (barra azul y roja respectivamente). (c) IMFr de CRT-PE a las 4 y 24 h de inducción de apoptosis (Medias \pm D.E., $n=3$, * $P<0.05$ ** $P<0.01$).



- Determinación del porcentaje de fagocitosis de células tumorales por los macrófagos THP1.

Se determinó el porcentaje de macrófagos THP1 que fagocitaron células A-427 previamente tratadas con campotecina, exposición a luz UV y el anticuerpo anti-Fas. Como controles se incluyeron células A-427 sin tratamiento y células a las que se les indujo necrosis. De esta forma, se determinó si alguno de los inductores de apoptosis favorecen la fagocitosis de las células tumorales, por los macrófagos, y si existe correlación con la externalización de la CRT a la membrana celular.

En general, los diferentes tratamientos muestran una tendencia a aumentar la fagocitosis de las células tumorales a las 4 h de inducción de muerte. La fagocitosis de las células tumorales A-427 control (sin inducción de apoptosis) fue de 3%, mientras que para los tratamientos fue de 5, 6, y 8% con campotecina, luz UV y anti-Fas respectivamente; no obstante, el tratamiento con el anticuerpo anti-Fas fue el único que aumentó significativamente la fagocitosis de las células tumorales.

A las 24 h, la fagocitosis debida a los tratamientos estudiados se acentuó; el incremento en el porcentaje de fagocitosis fue de 6, 8 y 10% post-tratamiento con campotecina, luz UV y anti-Fas respectivamente; siendo estadísticamente significativas las diferencias entre los tratamientos y el control. Así mismo, el anticuerpo anti-Fas indujo un mayor porcentaje de la fagocitosis de células tumorales a las 24 h (ver Figura 3a y 3b).

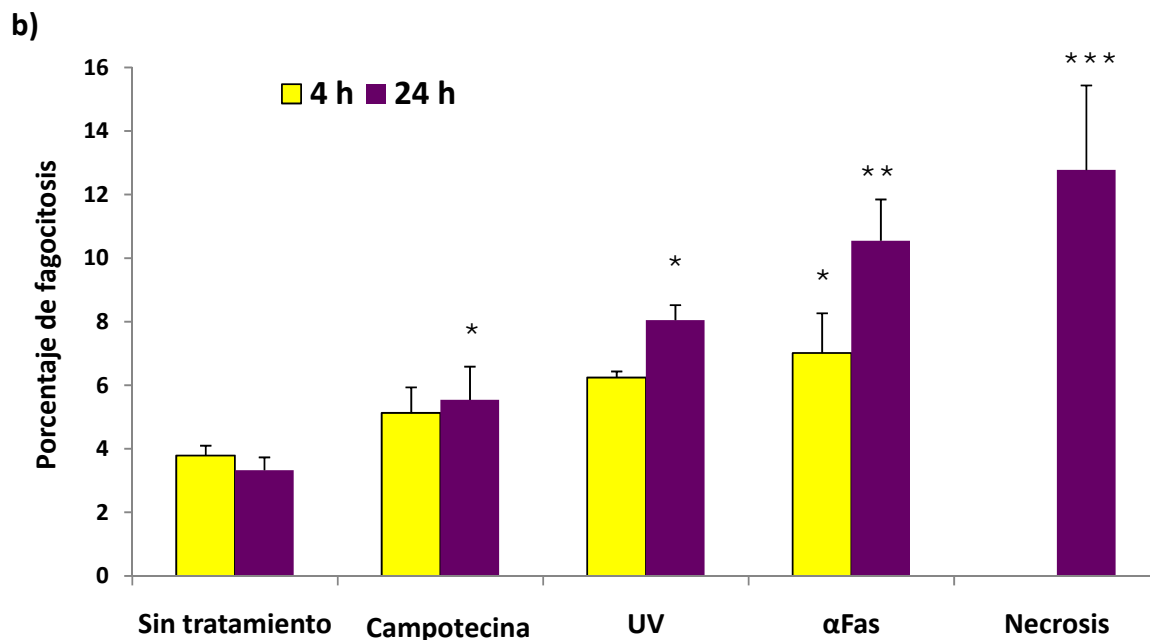
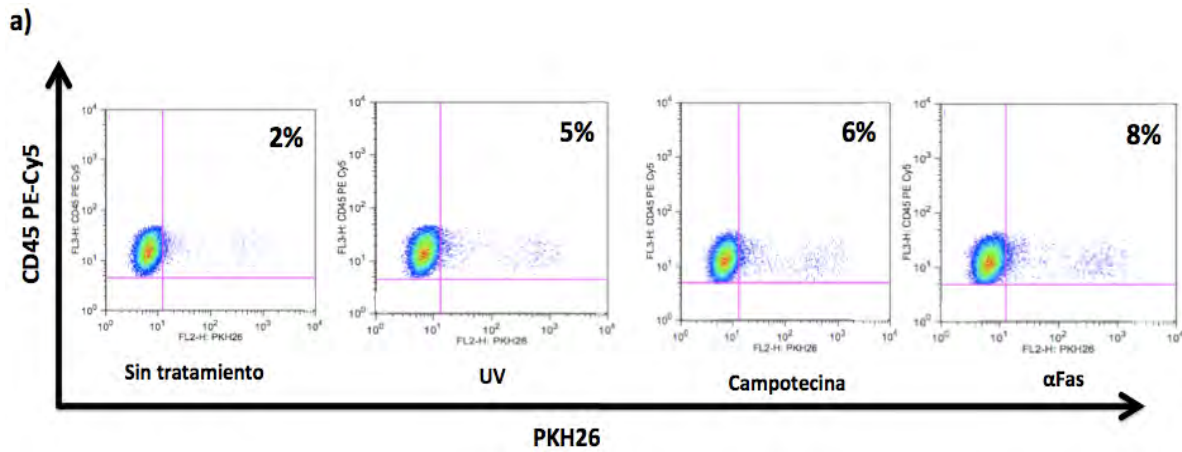


Figura 3. Determinación del porcentaje de fagocitosis de células A-427 tratadas con los inductores de apoptosis. (a) Gráficos de densidad, representativos de 3 experimentos independientes, donde se representa en el cuadrante superior izquierdo a los macrófagos THP1 (CD45+/PKH26-) que no fagocitaron células tumorales y en el cuadrante superior derecho a los macrófagos THP1 (CD45+/PKH26+) que fagocitaron células tumorales con 4 h de inducción de apoptosis. (b) Porcentaje de fagocitosis a las 4 y 24 h de inducción de apoptosis, barra amarilla y morada respectivamente (Medias \pm D.E., $n=3$, * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$).



- Inducción de apoptosis en líneas de carcinoma pulmonar con cisplatino.

Se determinó el porcentaje de células A-427, A-549, Calu-1 y 1.3.11 en apoptosis a las 6 h de exposición a diferentes concentraciones de cisplatino mediante el marcaje con Anexina V FITC y PI.

Las concentraciones citotóxicas de cisplatino para cada una de las líneas celulares se determinaron mediante el ensayo con alamar azul (datos no mostrados).

Los resultados muestran el porcentaje de células en apoptosis temprana y en apoptosis tardía o necrosis con respecto a los controles y las diferentes concentraciones de cisplatino utilizadas (ver Figura 4).

Los tratamientos a diferentes concentraciones de cisplatino se compararon con las células tumorales sin tratamiento y un control de excipiente, el cual consistió en una alícuota del fármaco inactivado con el fin de determinar si el excipiente donde está contenido el fármaco tenía algún efecto sobre las células tumorales. En todos los ensayos se observó que el control sin tratamiento y el control de excipiente se comportaron de manera similar induciendo el mismo porcentaje de células muertas, por lo que el excipiente no modifica el porcentaje de células en apoptosis.

Para la línea 1.3.11 se observó que a altas concentraciones de cisplatino (50 y 100 μM) incrementa el porcentaje de células en apoptosis temprana, en comparación con los controles sin tratamiento y excipiente (ver Figura 4). En cambio, la línea A-549 presentó la mayor sensibilidad a morir por el efecto del cisplatino, de tal manera que la concentración más baja de cisplatino (25 μM) aumentó en el porcentaje de células muertas, aproximadamente 70%, y principalmente se observaron en apoptosis tardía o necrosis (ver Figura 4).

La línea Calu-1 presentó un aumento en el porcentaje de células muertas por efecto del cisplatino; sin embargo, las diferencias con respecto a los controles solo fueron observables en el porcentaje de células en apoptosis tardía (ver Figura 4).

En la línea A-427 se observó un efecto dependiente de la concentración similar a la línea 1.3.11, el mayor porcentaje de células muertas se encontró en apoptosis temprana. (ver Figura 4).

Cabe mencionar que el tratamiento, a las 24 h, indujo en las líneas tumorales necrosis, al observarse, por microscopía óptica, sólo restos celulares en el cultivo

celular, por lo que no se hizo la determinación del porcentaje de apoptosis a este tiempo.

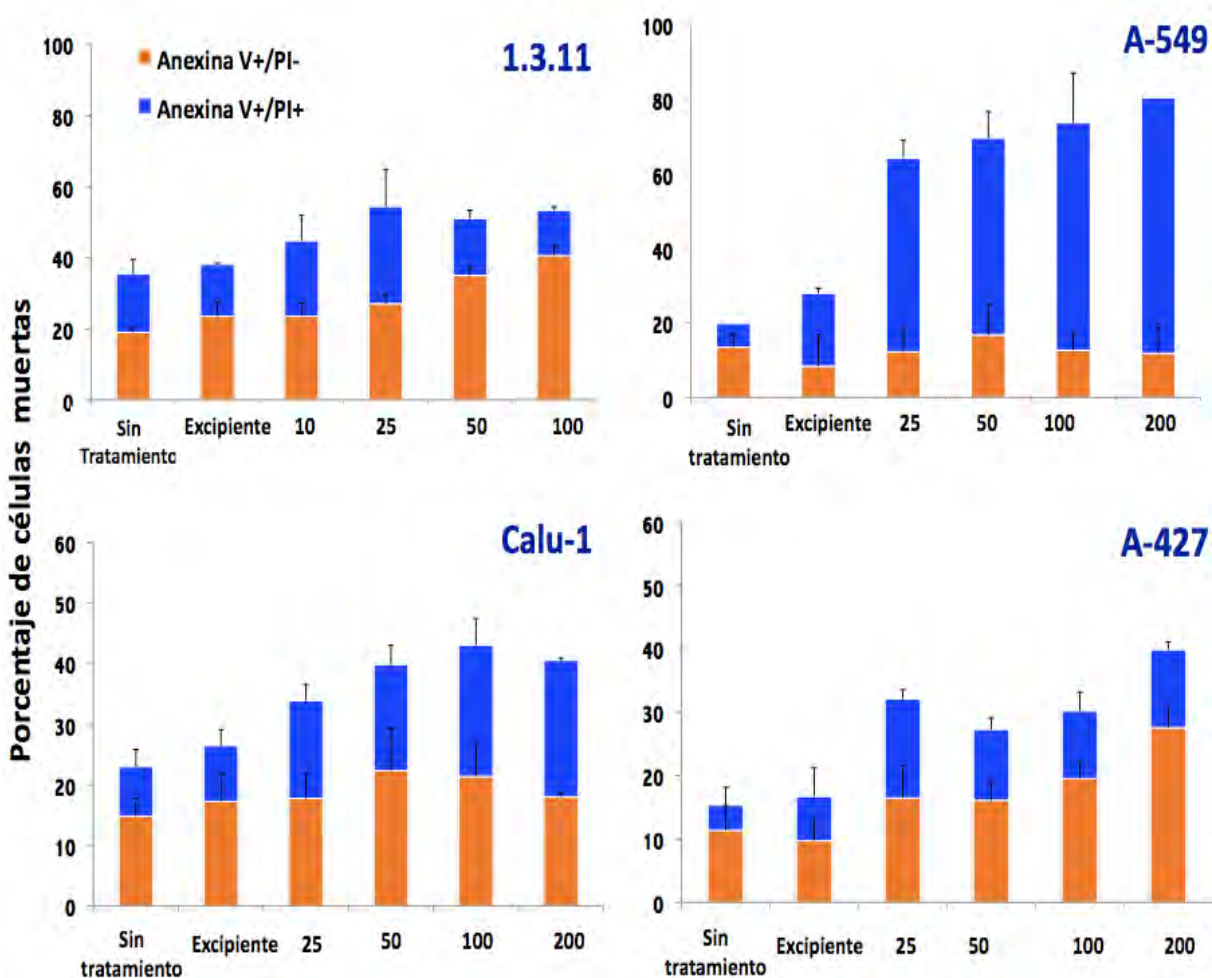


Figura 4. Gráfico de barras del porcentaje de células A-427, A-549, Calu-1 y 1.3.11 en apoptosis temprana y tardía a las 6 h de exposición a diferentes concentraciones de cisplatino (μM) mediante el marcaje con Anexina V FITC y PI. La barra naranja y azul representan las células en apoptosis temprana y apoptosis tardía o necrosis respectivamente. (medias \pm D.E., $n=2$).

- Detección de CRT en la membrana citoplásmica de las líneas de carcinoma pulmonar.

Se determinó la presencia de CRT en la membrana citoplásmica de las células tumorales 1.3.11, A-549, Calu-1 y A-427 a las 6 h de tratamiento con diferentes concentraciones de cisplatino.

Los resultados se muestran como histogramas de intensidad de fluorescencia debido a la marca CRT-PE. Los desplazamientos de señal de intensidad de fluorescencia de los tratamientos incluyendo el control sin tratamiento y excipiente fueron determinados con respecto a la señal emitida por células tumorales de cada línea tratadas con cisplatino a una concentración de 200 μM y marcadas únicamente con el anticuerpo secundario.

Se observó que las líneas celulares al ser tratadas con cisplatino no indujeron la translocación de la CRT a la membrana celular ya que no hubo diferencias entre la IMF de las células tumorales CRT+ provenientes de los tratamientos con cisplatino, con respecto a los controles sin tratamiento y excipiente (ver Figura 5).

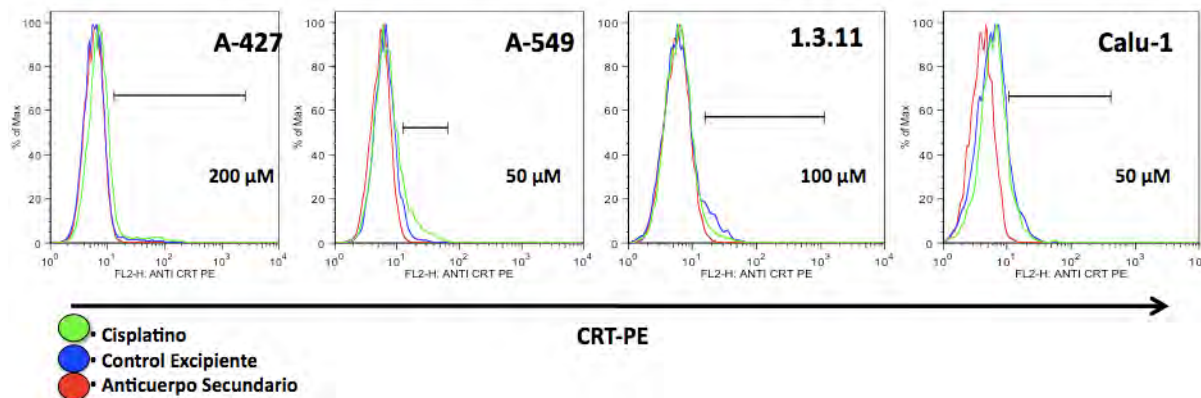


Figura 5. Histogramas de intensidad de fluorescencia, representativos de tres experimentos independientes, de la expresión de CRT en las líneas de carcinoma pulmonar tratadas durante 6 h con cisplatino a la concentración en la que se determinó mayor porcentaje de células en apoptosis temprana.



- Determinación del porcentaje de fagocitosis de las células A-427 tratadas con cisplatino

Se determinó el porcentaje de fagocitosis de células tumorales A-427 previamente tratadas con cisplatino por los macrófagos THP1. De esta forma se determinó si el previo tratamiento de las células tumorales con cisplatino favorece la fagocitosis de éstas por los macrófagos THP1.

Los resultados muestran el porcentaje de macrófagos THP1 que han fagocitado células tumorales (células CD45+/PKH26+), en función de la concentración de cisplatino a la que fueron expuestas las líneas tumorales a las 6 y 24 h incluyendo el control sin tratamiento y excipiente (ver Figura No 6).

Se consideró relevante hacer la determinación a 24 h para comparar la fagocitosis entre los tratamientos que incluyen la campotecina, luz UV y anti-Fas.

A las 6 h de inducción de apoptosis solo en la concentración de 100 μ M de cisplatino se favoreció la fagocitosis de las células tumorales A-427, siendo las diferencias entre el tratamiento de cisplatino y los controles estadísticamente significativas. No obstante, a las 24 h de inducción de apoptosis a las tres concentraciones de cisplatino a las que fueron expuestas las células tumorales (25, 50 y 100 μ M), aumento el porcentaje de fagocitosis, 15, 14 y 11% respectivamente, siendo las diferencias entre los tratamientos y los controles estadísticamente significativas (ver Figura 6).

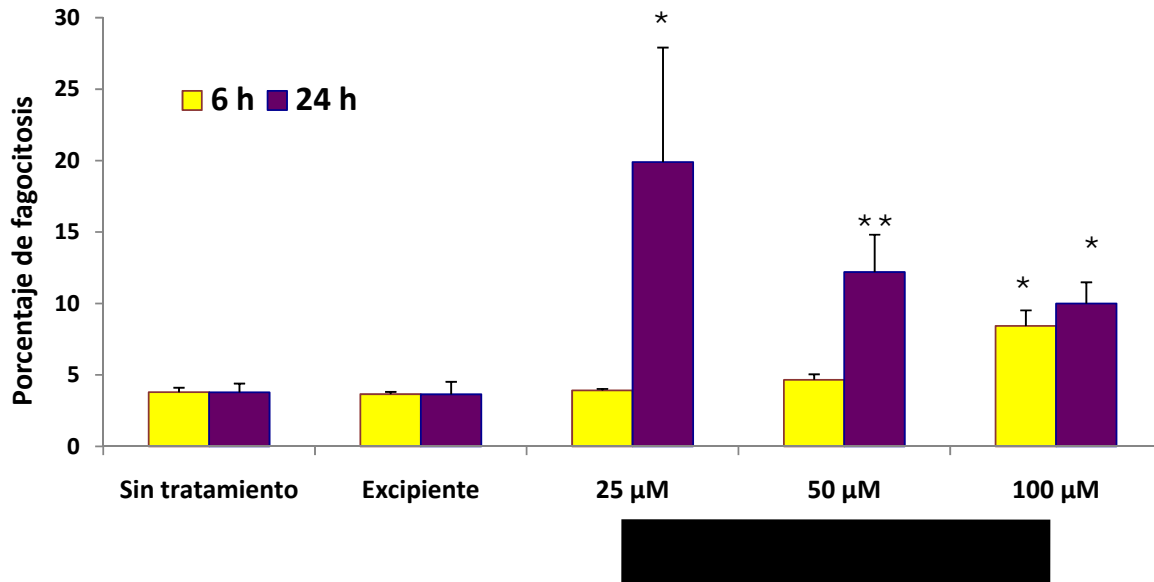


Figura 6. Porcentaje de macrófagos THP1 que fagocitaron células tumorales A-427 previamente expuestas a diversas concentraciones de cisplatino durante 6 y 24 h (barra amarilla y morada respectivamente) (Medias \pm D.E., n=2, *P<0.05 **P<0.01 con respecto al control de excipiente y sin tratamiento).

- Correlación entre el porcentaje de células en apoptosis temprana y el porcentaje de células fagocitadas.

Se realizaron las curvas de correlación entre el porcentaje fagocitosis en función del porcentaje de células A-427 en apoptosis temprana tratadas con campotecina, exposición a luz UV, anticuerpo anti-Fas (ver figura 7a y 7b) y cisplatino (ver figura 7c).

En la Figura 7a y 7b se observa que, en ambos tiempos de inducción de apoptosis (4 y 24 h) hay una correlación directa, al incrementarse el porcentaje de células en apoptosis temprana aumenta el porcentaje de fagocitosis. Un comportamiento similar también se observó con el cisplatino (ver Figura 7c) a las 6 h de tratamiento.

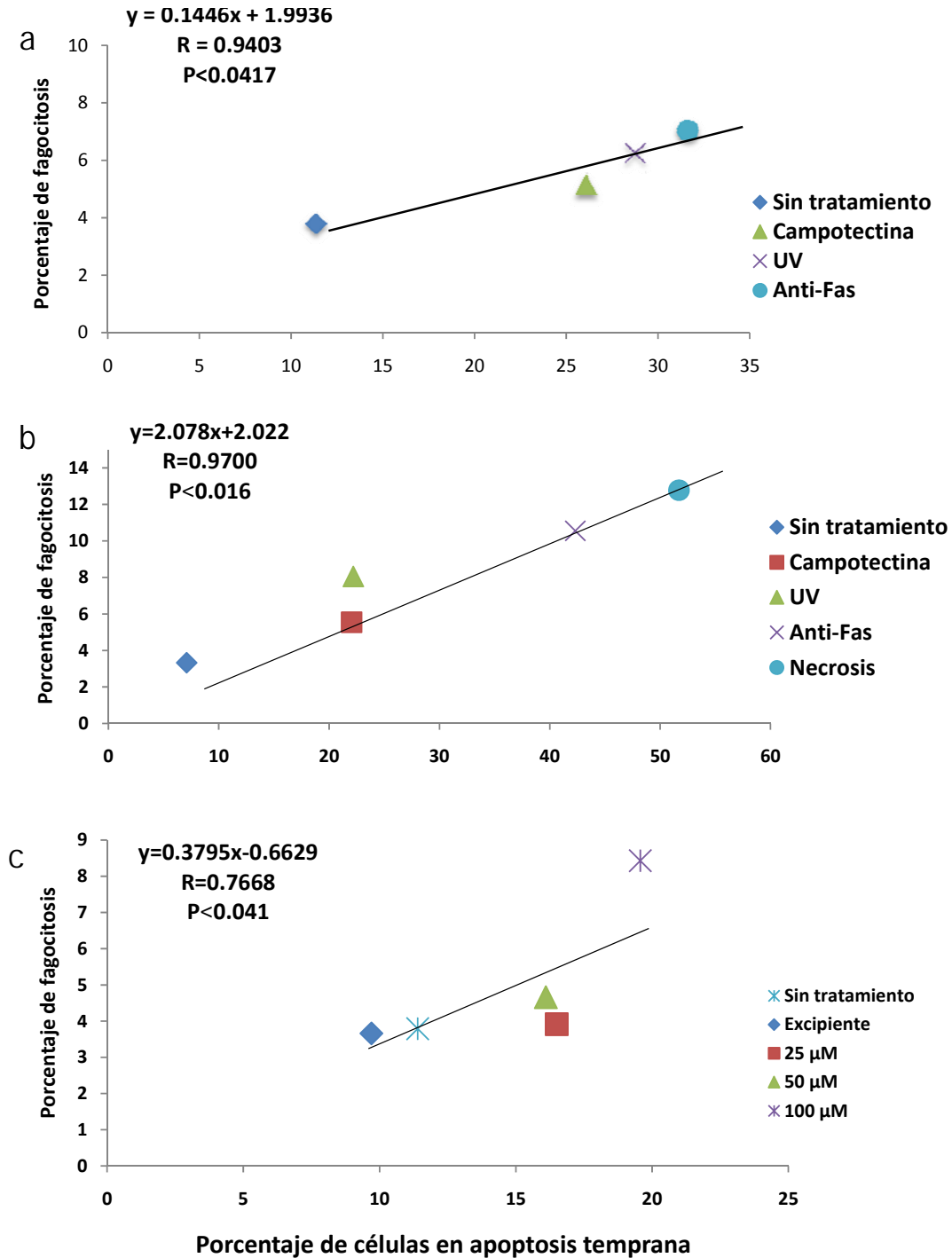


Figura 7. Correlación entre el porcentaje de fagocitosis y el porcentaje de células en apoptosis temprana. Se ilustra la correlación a las 4 h y 24 h (gráfico a y b respectivamente) de inducción de apoptosis con campotectina, luz UV y anti-Fas y a las 6 h de inducción de apoptosis con cisplatino (gráfico c).



DISCUSIÓN

El modelo experimental que se utilizó para la inducción de apoptosis fue la línea A-427 por ser de tipo adenocarcinoma pulmonar, la cual se ha descrito es el tipo histológico de cáncer pulmonar más frecuente (Spiro *et al.* 2009). Se ha demostrado, que esta línea es sensible a morir por apoptosis por diferentes inductores incluyendo la luz UV y la campotecina; además, expresa Fas en la membrana celular y no tiene alterada la maquinaria para la inducción de muerte por esta vía, por lo tanto es susceptible a morir por la vía del receptor de Fas (Nambu *et al.* 1998).

Para la detección de CRT en la membrana celular se empleó la luz UV como control positivo, ya que se ha reportado que induce la externalización de la CRT en líneas tumorales de origen murino; mientras que la campotecina se empleó como control negativo, ya que induce un porcentaje reducido de externalización de la CRT en las mismas líneas tumorales (Gardai *et al.* 2005 y Obeid *et al.* 2007b). Además se evaluó si la vía del receptor, empleando un anticuerpo agonista anti-Fas, favorece la externalización de la CRT, ya que se ha reportado que la externalización de la CRT requiere la activación de la caspasa 8.

Nuestros resultados muestran que el anticuerpo anti-Fas, la luz UV y la campotecina inducen un aumento en el porcentaje de células A-427 en apoptosis temprana a las 4 h; sin embargo, a las 24 h de tratamiento con campotecina y con luz UV, las células tumorales sufrieron necrosis secundaria al observarse abundantes restos celulares y pocos cuerpos apoptóticos en el cultivo celular. En cambio, las células tratadas con el anticuerpo anti-Fas se encontraron principalmente en apoptosis temprana, esto probablemente sea porque a la vía le tome más tiempo la inducción de apoptosis, de tal manera que las células no sufren de necrosis secundaria (Nambu *et al.* 1998).

Se ha reportado que al exponer células tumorales, como CT26 de carcinoma de colon o fibroblastos embrionarios de ratón a luz UV tipo C, las células mueren por apoptosis y se externaliza la CRT en la membrana celular (Gardai *et al.* 2005, Obeid *et al.* 2007b, Panaretakis *et al.* 2008). En cambio en nuestro estudio, al exponer a la línea A-427 a luz UV, no se detectó CRT en la membrana celular. Se ha especificado que el tipo de luz UV debe ser C ($\lambda=100 - 280$ nm) para que se favorezca la externalización de la CRT; sin embargo, la lámpara de luz UV utilizada en nuestro estudio, la longitud máxima alcanzada correspondió al tipo de luz A y B ($\lambda=280 - 400$ nm), por lo cual,



posiblemente no se genere el estrés oxidativo necesario para la externalización de la CRT. Se ha descrito que uno de los principales daños celulares generados por la exposición a luz UV es la generación de aductos en el DNA, como dímeros de timina. La línea A-427 no tiene mutado p53, de tal manera que el daño generado al DNA puede ser censado por p53 y se favorezca la inducción de apoptosis pero no la externalización de la CRT (Tolis *et al.* 1999). O bien, las células tumorales humanas posiblemente no externalizan CRT al morir por efecto de la luz UV; no hay reportes de que alguna línea celular humana externaliza la CRT por efecto de la luz UV.

Nuestros resultados indican que la campotecina induce un bajo porcentaje de externalización de CRT, lo que concuerda con lo reportado por Obeid *et al.* 2007b, donde describe niveles bajos de externalización de la CRT en líneas celulares de ratón. El mecanismo de acción de la campotecina y sus derivados es mediante la inhibición de la Topoisomerasa 1 (Pommier *et al.* 2009); se ha descrito que el daño genotóxico ejercido por el fármaco y sus derivados en otras líneas celulares de cáncer pulmonar es censado por p53 siendo éste el responsable de la inducción de apoptosis (Tolis *et al.* 1999). Es probable que al depender la señalización de inducción de apoptosis de p53, las células A-427 no transloquen la CRT a la membrana celular.

La apoptosis mediada por el anticuerpo anti-Fas indujo la externalización de la CRT a las 4 h. Durante esta vía se activa la caspasa 8 que posteriormente escinde a BID y Bap31 generando los subproducto tBID y p20 respectivamente; estos subproductos interactúan con BAX y BAK para desencadenar la vía de la mitocondria; esta cascada de señalización favorece la translocación de la CRT a la membrana celular y concuerda con lo descrito por la inducción de apoptosis con antraciclinas y oxiplatino (Panaretakis *et al.* 2009 y Garg *et al.* 2010).

Contrario a lo observado a las 4 h de tratamiento con el anticuerpo anti-Fas, a las 24 h no se detectó CRT en la membrana celular. Esto puede deberse a que la proteína ya no se externaliza en estadios tardíos de la apoptosis; dado que la CRT se expresa antes de que la célula presente los cambios morfológicos y bioquímicos asociados a la apoptosis, incluso antes de que se externaliza la fosfatidilserina (Obeid *et al.* 2007). Además, la vía de excitosis usada por la CRT para su externalización es dependiente del flujo Ca^{2+} (Ungar *et al.* 2003) y a las 24 h al no haber flujo de Ca^{2+} pudiera ser que no haya externalización de CRT o haya reingresado al interior de la célula. Por



último, puesto que la externalización de la CRT es dependiente de ATP, a las 24 h, ya no hay el ATP requerido que mantenga la externalización de la CRT en la membrana celular.

Por otro lado, se probó si la externalización de la CRT favorece la fagocitosis de las células apoptóticas como se ha descrito en modelos murinos (Gardai *et al.* 2005 Obeid *et al.* 2007a). Se utilizaron los macrófagos THP1 los cuales se determinó que son capaces de fagocitar células A-427 apoptóticas.

Las células tratadas con el anticuerpo anti-Fas mostraron un mayor porcentaje de células que translocaron la CRT con respecto a los otros tratamientos; así mismo se observó un aumento en la fagocitosis. Sin embargo, las diferencias en el porcentaje de fagocitosis provenientes de los diferentes tratamientos fueron modestas, contrario a lo observado por Obeid *et al.* 2007b donde encontró diferencias de fagocitosis significativas. La falta de la expresión o secreción de algún DAMP, como la HMGB1 o HSPs, puede ser suficiente para que la muerte celular no sea inmunogénica y este podría ser el caso del anticuerpo anti-Fas, por lo que no se favorece un aumento importante en la fagocitosis.

Además, se observó que a las 24 h de tratamiento con el anticuerpo anti-Fas se favoreció la fagocitosis de las células tumorales en comparación con los otros tratamientos, aún cuando no se encontró CRT en la membrana celular, por lo que el aumento de la fagocitosis no está mediado por la externalización de la CRT. Posiblemente las señales de la apoptosis fisiológica sean las que favorezca la fagocitosis de las células tumorales, dado lo determinado en los análisis de correlación entre el porcentaje de células en apoptosis temprana y el porcentaje de fagocitosis (Wu *et al.* 2006). En estos análisis se encontró que la fagocitosis de las células tumorales está en función del aumento en el porcentaje apoptosis temprana, comportamiento que se encontró en todos los tratamientos a las 4 y 24 h de inducción de apoptosis. Puesto que el tratamiento con el anticuerpo anti-Fas indujo los mayores porcentajes de apoptosis temprana también indujo los más altos porcentajes de fagocitosis.



- Efecto del cisplatino en la translocación de la CRT a la membrana celular y en la fagocitosis en líneas de carcinoma pulmonar

El cisplatino es uno de los principales tratamientos contra el cáncer pulmonar por lo que se consideró relevante evaluar si las líneas de carcinoma pulmonar externalizan la CRT. Nuestros resultados indican que las líneas de carcinoma pulmonar presentaron diferente sensibilidad a morir por efecto de la exposición a cisplatino, esto podría ser debido a las características genotípicas y fenotípicas de cada línea. Por ejemplo, Calu-1 tiene mutado p53 por lo que podría ser insensible al daño genotóxico mediado por el cisplatino y sólo a altas concentraciones del fármaco se observó necrosis, posiblemente debida al daño de proteínas, fosfolípidos y la generación de estrés oxidativo (Cammano *et al.* 1991). En cambio, la línea A-549 fue la más sensible al efecto del cisplatino, de tal manera que a concentraciones bajas hubo un alto porcentaje de células muertas por necrosis, mientras que las otras líneas 1.3.11 y A-427 fueron sensibles a morir por apoptosis.

No se ha determinado si el cisplatino favorece la externalización de la CRT en líneas tumorales humanas. Nuestros resultados indican que ninguna línea de carcinoma pulmonar expuesta a cisplatino externaliza la CRT, concordando con lo reportado por Tesniere *et al.* 2009 quien evaluó dicho fenómeno en líneas celulares de ratón.

La externalización de la CRT sólo se ha documentado cuando la célula muere por apoptosis, dado que en las líneas Calu-1 y A-549 el daño citotóxico generado por el cisplatino indujo necrosis, en este tipo de muerte no se promueve la externalización de la CRT.

Se ha descrito que un análogo del cisplatino, el oxiplatino, promueve la externalización de la CRT en la membrana celular en las líneas tumorales murinas (Tesniere *et al.* 2009), sería conveniente probar este fármaco en las líneas de carcinoma pulmonar y determinar si las líneas son capaces de translocar la CRT.

La falta de eficacia del tratamiento quimioterapéutico puede ser debido a la generación de resistencia a los fármacos o bien la falta de capacidad de la célula tumoral de morir de forma inmunogénica (Obeid *et al.* 2007a). Posiblemente los tumores pulmonares no expresan señales inmunogénicas, como la externalización de la CRT, como un mecanismo de evasión a la respuesta inmune.



Se probó con la línea A-427 si el cisplatino favorece la fagocitosis de las células tumorales, ya que no existen reportes del tema. Observamos que el cisplatino promovió altos porcentajes de fagocitosis y que está directamente correlacionados con el aumento en el porcentaje de células en apoptosis temprana. Sin embargo, también se ha descrito que el cisplatino si bien no favorece la externalización de la CRT sí favorece la secreción de la HMGB1 (Tesniere *et al.* 2009), posiblemente la secreción de dicho DAMP es el responsable del aumento en la fagocitosis o bien algún otro DAMP por investigar.

Nuestros experimentos probaron que el tratamiento con el anticuerpo anti-Fas promovió la externalización de la CRT y hubo un aumento en la fagocitosis de las células tumorales; pero este fenómeno parece depender de la cantidad de células en apoptosis temprana y no de la expresión de la CRT en la membrana celular, por lo que el estímulo pudiera no ser inmunogénico. Se requieren estudios para demostrar si los macrófagos que fagocitan las células tratadas con el anti-Fas se activan. Sería conveniente también evaluar la muerte celular por algún otro receptor de muerte como TRAIL o TNF α para poder determinar si la inducción de apoptosis por la vía del receptor es o no inmunogénica. Por otro lado, el cisplatino indujo la apoptosis y la fagocitosis de las células tumorales; pero este último no se debió a la externalización de la CRT, para considerar a la muerte celular como inmunogénica implicaría la demostración de que los macrófagos se activan al fagocitar células tumorales apoptóticas previamente tratadas con cisplatino.



CONCLUSIONES

- De los tratamientos empleados, la luz UV, la campotecina y el anticuerpo agonista Anti-Fas, este último, indujo el mayor porcentaje de células A-427 CRT+ a las 4 h; pero a las 24 h no se detectó CRT en la membrana celular. No obstante, el anticuerpo anti-Fas indujo un aumento en el porcentaje de fagocitosis a los dos tiempos con respecto a los otros tratamientos; sin embargo, se determinó que el aumento de la fagocitosis estuvo en función del aumento de células en apoptosis temprana y no por la externalización de CRT.
- El cisplatino no indujo la externalización de la CRT en ninguna de las líneas de carcinoma pulmonar probadas, aunque sí indujo un aumento en el porcentaje de fagocitosis de células A-427 en función de la concentración de cisplatino.



REFERENCIAS

1. Borczuk C., Toonkel R., Powell C. **Genomics of Lung Cancer**. Proc Am Thorac Soc. 2009;6:152-158.
2. Brown M., Attardi L. **The role of apoptosis in cancer development and treatment response**. Nat Rev Cancer. 2005;5:231-237.
3. Cammano J., Ruggeri B., Momiki S., Sickler A., Zhang SY., Klein JP., **Detection of p53 in primary lung tumors non small cell lung carcinoma cel lines**. Am. J. Pathol. Am J Pathol. 1991;139: 839-845.
4. Chabner B., Longo D. **Cancer Chemotherapy and Biotherapy principles and practice**. Lippincott Williams & Wilkins 4ª edición Philadelphia, PA USA (2006).
5. Chipuk J., Green D. **How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization**. Trends Cell Biol. 2008;18:157-64.
6. Cohen G. **Caspases: the executioners of apoptosis**. Biochem J. 2003;15:695-702.
7. Cotter T. **Apoptosis and cancer: the genesis of a research fiel**. Nat Rev Cancer. 2009;9:501-507.
8. Dash P. **Apoptosis**
9. DeBerardinis R., Cheng T. **Q's next: The diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer**. Oncogene 2004;313:459-65.
10. Duprez L., Wirawan E., Vande Bergue T., Vandenabeele P. **Major cell death pathways at a glance**. Microbes Infect. 2009;11(13):1050-62.
11. Elmore S. **Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death**. Toxicol Pathol. 2007;35:495-516.
12. Ercal N., Gurer-Orhan H., Aykin-Burns N., **Toxic Metals and Oxidative Stress Part I: Mechanisms Involved in Metal induced Oxidative Damage**. Curr Top Med Chem. 2001; 1: 529-539
13. Fink S., Cookson B. **Apoptosis, Pyroptosis and Necrosis: Mechanistic description of Dead and dying Eukaryotic cells**. Infect Immun. 2005;74(4):1907-1917.
14. Fletcher JL., Huang D. **BH3-only proteins: orchestrating cell death**. Cell Death Differ. 2006;13(8):1268-1271.
15. Gardai S., McPhillips K. A., Frasch C., Janssen W., Starefeldt A. **Cell-Surface Calreticulin Initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the Phagocyte**. Cell 2005;123:321-334.
16. Garg A., Nowis D., Golab J., Vandenabeele P., Krysko D., Agostinis P., **Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: An emerging amalgamation**. Biochim Biophys Acta. 2010;1805:53-71.
17. Gonzalez V., Fuertes M. **Is cisplatin-Induced Cell Death Always Produced Apoptosis?** Mol Pharmacol. 2001;59(4):657-63.
18. Green D., Ferguson T., Zitvogel L., Kroemer G. **Immunogenic and tolerogenic cell death**. Nat Rev Immunol. 2009;9(5):353-63.
19. Guota S. **Molecular steps of death receptors and mitochondrial pathways of apoptosis**. Life Sci. 2001a;69(25- 26):2957-2964.
20. Häcker G., Weber A. **BH3-only proteins trigger cytochrome c release, but how?** Arch Biochem Biophys. 2007;462: 150-155.
21. Haynes N., Van der Most R., Lake R., Smyth J. **Immunogenic anti-cancer chemotherapy as an emerging concept**. Curr Opin Immunol. 2008;20:545-



- 557.
22. Hengartner M. **The Biochemistry of apoptosis.** Nature 2000;407:770-776.
 23. Herbst RS., Heymach JV., Lippman SM. **Lung Cancer.** N Engl J Med 2008; 359(13):1367-80.
 24. Hotchkiss R., Stasser A., McDunn J., Swanson P., **Cell Death.** N Engl J Med. 2009; 361(16): 1570 - 1583.
 25. Jeannin P., Jaillon S., Delneste Y. **Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells.** Curr Opin Immunol 20:530–537 (2008).
 26. Jonhson S., Michalak M., Opas M., Eggleton P. **The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space.** Trends Cell Biol. 2001;11(3):122-9.
 27. Kepp O., Galluzzi L., Giordanetto F. **Disruption of the PP1/GADD34 complex induces calreticulin exposure.** Cell Cycle 2009a;8(23):3971-7.
 28. Kepp O., Tesniere A., Zitvogel L., Kroemer G. **The immunogenicity of tumor cell death.** Curr Opin Oncol. 2009b;21(1):71-6.
 29. Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri ES., Baehrecke EH. **Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009.** Cell Death Differ. 2009;16:3-11.
 30. Kroemer G., Martin S. **Caspase-independent cell death.** Nat Med. 2005;11(7):725-30.
 31. Kumar S. **Caspase function in programmed cell death.** Cell Death Differ 2007;14:32-43.
 32. Kurokawa M., Kornbluth S. **Caspases and Kinases in a Death Grip.** Cell. 2009;138: 838-54.
 33. López González JS., García Herrera V., Aguilar Cázares D., Medina Morales F. Rivera Rosales RM., Mandoki JJ., León Cardeño L., Velasco Velazquez MA., García Mondragon MJ., Molina Guerneros JA., Cervera Mendieta I. **Efecto citoestáticos de la cumarina de la 7 hidroxicumarina en tres líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar humano.** Rev Inst Nal Enf Res Mex. 1998;11:261-267.
 34. Maiti S., Balasubramanian K., Ramoth J., Schroit A. **-2-Glycoprotein 1-dependent Macrophage Uptake of Apoptotic Cells.** J Biol Chem 2008; 283(7):3761–3766.
 35. Martin R., Andersin P. **How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, Lung disease and cancer.** Nat Rev Immunol. 2009; 9(5):377-84.
 36. Montaner B., O'Donovan P., Reelfs O., Perret C., Zhang X., Xu Y. **Reactive oxygen-mediated damage to a human DNA replication and repair protein.** EMBO Rep. 2007;8(11):1074-9.
 37. Nambu Y., Hughes S., Rehemtulla A., Hamstra D., Orringer M. **Lack of cell surface Fas/APO-1 Expression in Pulmonary Adenocarcinomas.** J Clin Invest. 1998;101(5):1102-10.
 38. Obeid M., Tesniere A., Panaretakis., Tufi R., Joza R., Van Endert P. **Ecto-calreticulin in immunogenic chemotherapy.** Immunol Rev. 2007a;220:22-34.
 39. Obeid M. **Anticancer activity of targeted proapoptotic peptides and chemotherapy is highly improved by targeted cell surface calreticulin-**



- inducer peptides.** Mol Cancer Ther. 2009;8(9):2693-707.
40. Obeid M., Tesniere A., Ghiringhelli F., Fimia G., Apetoh L., Perfettini JL., Castedo M., Mignot G. **Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death.** Nat Med. 2007b;13(1):54-61.
 41. Ott M., Norberg E., Zhivotovsky B., Orrenius S. **Mitochondrial targeting of tBID/BAX: a role for the TOM complex?** Cell Death Differ. 2009;16:1075-1082.
 42. Panaretakis T., Kepp, O., Brockmeier U., **Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death.** EMBO J. 2009;28(5):578-90.
 43. Panaretakis T., Joza N., Modjtahedi M. **The co-translocation of Erp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death.** Cell Death Differ. 2008;15(9):1499-1509.
 44. Pommier Y. **DNA Topoisomerase I inhibitor: Chemistry, biology and interfacial inhibition.** Chem Rev 2009;109(7): 2894-2902.
 45. Ravichandran K., Lorenz U. **Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal.** Nat Rev Immunol. Nat Rev Immunol. 2007;7(12):964-74.
 46. Spiro S.G., Huber R. M., Janes S. M. **Thoracic Malignancies, The European Respiratory Monograph vol 44.** Edit. European Respiratory Society (2009).
 47. Tesniere A., Schlemmer F., Boige V. **Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin.** Oncogene 2009;2:1-10.
 48. Tesniere A., Panaretakis T., Kepp O., Apetoh L., Ghiringhelli F., Zitvogel L., Kroemer G. **Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death** Cell Death Differ. 2008;15(1):3-12.
 49. Tesniere A., Apetoh L., Ghiringhelli F., Joza A., Panaretakis T., Kepp O., Schlemmer F., Zitvogel L., Kroemer G. **Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm.** Curr Opin Immunol. 2008a;20:504-511.
 50. Tesniere A., Schlemmer F., Boige V. **Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin.** Oncogene 2010;29:482-491.
 51. Tesniere A., Panaretakis T., Kepp O., Ghiringhelli F., Zitvogel L., Kroemer G. **Molecular Characteristics of immunogenic cancer cell death.** Cell death Differ. 2008b;15:3-12.
 52. Timmer JC., Salvesen GS. **Caspase substrates.** Cell Death Differ. 2007;14:66-72.
 53. The Cancer Council Victoria. **Lung cancer: for people with cancer, their family and friends.** Edition January Melbourne Australia (2008).
 54. Trachootham D., Alexandre J., Huang P. **Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?** Nat Revs Drug Discov. 2009;8:579-591.
 55. Tolis C., Peters GJ., Ferreira CG., Pinedo HM., Giaccone G. **Cell cycle disturbances and apoptosis induced by Topotecan and gemcitabine on human lung cancer cell lines.** Eur J Cancer. 1999;35(5):796-80.
 56. Ungar D., Hughson F. **SNARE proteins structure and function.** Annu Rev Cell Dev Biol. 2003;19:493-517.
 57. Van Delft M., Huang D. **How the BCL-2 family of proteins interact to regulate apoptosis.** Cell Res. 2006;16(2):203-1.
 58. Van Loo G., Saens X., Van Gurp M., MacFarlane M., Ceel H. **The role of**



- mitochondrial factor in apoptosis: A Russian roulette with more than one bullet.** *Death Cell Differ* 2002; 9: 1031-1042.
59. Vermeulen K., Von Bockstaele D., Berneman Z. **Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer.** *Ann Hematol* 2005; 84: 627-639.
60. Webb SJ., Harrison DJ., Wyllie AH. **Apoptosis: an overview of the process and its relevant in disease.** *Adv Pharmacol.* 1997; 41: 1-34.
61. Wu Yi., Tibrewal N., Birge R. **Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill.** *Trends Cell Bio* 2006; 16(4): 189-197.